Aus der Augenklinik des Klinikum Charlottenburg
der Freien Universität Berlin
Direktor: Prof. Dr. med. J. Wollensak

Vergleichende Studie über die Hemmung der epithelialen Regeneration durch die Virustatika 5-Trifluormethyl-2'-desoxyuridin (F3TdR), Phosphonoessigsäure (PAA), Phosphonoameisensäure (PFA) und zwei neue Phosphatanaloga an der Hornhaut des Kaninchen mit einem neuen modifizierten standardisierten computergestützten Auswertungsverfahren

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde an den humanmedizinischen Fachbereichen der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Hjalmar Nekarda
aus Stade
Berlin ~~1984~~
1985

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41549615_0007

Aus der Augenklinik des Klinikum Charlottenburg
der Freien Universität Berlin
Direktor: Prof. Dr. med. J. Wollensak

Vergleichende Studie über die Hemmung der epithelialen Regeneration durch die Virustatika 5-Trifluormethyl-2'-desoxyuridin (F3TdR), Phosphonoessigsäure (PAA), Phosphonoameisensäure (PFA) und zwei neuen Phosphatanaloga an der Hornhaut des Kaninchen mit einem neuen modifizierten standartisierten computergestützten Auswertungsverfahren

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde an den
humanmedizinischen Fachbereichen der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Hjalmar Nekarda
aus Stade
Berlin 1984

Gedruckt mit Genehmigung der medizinischen Fachbereiche der Freien Universität Berlin

Referent: Prof. Dr. J. Wollensak
Korreferent: Prof. Dr. H. Witschel

Promoviert am: 18.03.1985

Inhaltsverzeichnis

	Seite
I. Einleitung und Literaturübersicht	
1. Einleitung und Fragestellung	6
2. Regeneration des Hornhautepithels	20
3. Virustatika	28
3.1 5-Trifluormethyl-2'-desoxyuridin (F3TdR,TFT)	
3.1.1 Struktur und Pharmakokinetik	28
3.1.2 Pharmakodynamik	30
3.1.3 Experimentelle und klinische Studien	34
3.1.4 Toxikologie und Nebenwirkungen	37
3.2 Phosphonoessigsäure (PAA)	
3.2.1 Struktur und Pharmakokinetik	40
3.2.2 Pharmakodynamik	41
3.2.3 Experimentelle Studien	42
3.2.4 Toxikologie und Nebenwirkungen	44
3.3 Phosphonoameisensäure (PFA)	
3.3.1 Struktur und Pharmakokinetik	46
3.3.2 Pharmakodynamik	46
3.3.3 Experimentelle Studien	48
3.3.4 Toxikologie und Nebenwirkungen	49
3.4 Phosphatanaloga N2825(N5), N2826(N6)	50
II. Material	52
1. Tiermaterial	52
2. Substanzen	52
3. Operationsmaterial	54
4. Photomaterial	54

Seite

III. Methode
1. Epithelabrasio
2. Histologie 45
3. Befunddokumentation 45
3.1 Allgemeines 45
3.2 Zeichnungen 57
3.3 Photodokumentation 57
4. Versuchsplanung 58
5. Statistik 59

IV. Versuche
1. Versuch I
1.1 Durchführung 61
1.2 Ergebnis
1.2.1 1 % N5 Tropfen 61
1.2.2 1 % N6 Tropfen 65
1.2.3 1 % PFA Tropfen 68
1.2.4 1 % PAA Tropfen 71
1.2.5 2 % TFT Salbe 75
1.3 Vergleich der Substanzgruppen
1.3.1 Abheilzeiten 79
1.3.2 Abheilungsverlauf 80

2. Versuch II
2.1 Durchführung 89
2.2 Ergebnisse
2.2.1 N5 5 % Tropfen 89
2.2.2 N6 5 % Tropfen 92
2.2.3 PFA 5 % Tropfen 95
2.2.4 PAA 5 % Tropfen 99
2.2.5 TFT 1 % Tropfen 104

Seite

2.3 Vergleich der Substanzgruppen
2.3.1 Abheilzeiten 110
2.3.2 Abheilungsverlauf 112

3. Vergleich beider Versuche
3.1 Konjunktivale Reaktion 116
3.2 Abheilzeiten 116
3.2.1 Paarweiser Vergleich der Abheilzeiten zu der jeweiligen Substanz 119
3.2.2 Vergleich der einzelnen Substanzgruppen nach Abheilzeiten 120
3.3 Abheilungsverlauf
3.3.1 Paarweiser Vergleich der Flächen und der Regenerationsgeschwindigkeiten 122
3.3.2 Vergleich der einzelnen Substanzgruppen nach Flächen und Regenerationsgeschwindigkeiten 125

V. Diskussion
1. Wertigkeit der Methode und Analyse der Regenerationskinetik 128
2. Vergleich der Ergebnisse mit dem Schrifttum 142

VI. Zusammenfassung 154

VII. Literaturverzeichnis 157

VIII. Anhang I Histologische Abbildungen 179

IX. Dank 186

X. Lebenslauf 187

I. EINLEITUNG und LITERATURÜBERSICHT

1. Allgemeine Einleitung und Fragestellung

Die Infektion des Menschen mit dem Herpes simplex-Virus Typ I (HSV-1) und Typ II (HSV-2) ist eine endemisch verlaufende Kontaktinfektion. Der Mensch stellt das Erregerreservoir dar. Die Durchseuchung der Bevölkerung ist geographisch unterschiedlich. Serumantikörper finden sich in Mitteleuropa bei 48 % der 14- bis 40-jährigen und in mehr als 90 % bei älteren Personen (NASEMANN, 1979). Andere Autoren berichten über Serumantikörper in 60 % bei 4 bis 5-jährigen und über 90 % bei den 15-jährigen (WOLLENSAK, 1966). In den USA liegt die Durchseuchung der 5-jährigen bei 80 % (KAUFMANN, 1971).

Die primäre lokale mucocutane Infektion verläuft in 99 % inapparent. In den ersten 10 bis 20 Tagen steigt der Serumtiter eines spezifischen IgM-Antikörpers und etwas verzögert eines IgG-Antikörpers an. Danach bleibt ein konstanter Serumtiter der Antikörper gegen das sogenannte virusinduzierte typisierende V-Antigen und gegen das sogenannte allgemeine lösliche S-Antigen bestehen (SÖLTZ und SZÖTS, 1959). Vor einem klinischen Rezidiv fällt der Titer des Antikörpers gegen das S-Antigen ab und steigt danach wieder kontinuierlich an.

85 % der primären Infektionen werden in der Zeit zwischen dem 10. Lebensmonat und dem 3. Lebensjahr mit einer Häufung in dem 14. Lebensmonat beobachtet. Die primäre Eintrittspforte ist in den meisten Fällen die Mundschleimhaut nach Mikrotraumen (LENNARTZ, 1979).
In 1 % der Fälle kommt es zu einer akuten primären Infektion von 6 bis 10 Tagen Dauer mit der typischen Ausbildung von Vesicula und Aphten, die sich klinisch als akute Gingivostomatitis, Vulvovaginitis, Keratokonjunktivitis

oder als Ekzema herpeticum mit anschließender Virämie, Fieber und lokaler Lymphadenitis manifestiert. Während der klinischen Manifestation bleibt der Herpesvirus für einige Woche im Speichel, Tränenflüssigkeit oder Stuhl nachweisbar. In 5 bis 7 % kommt es zu Dauerausscheidern.
Das akute Ekzema herpeticum führt häufig bei Neugeborenen nach der Virämie zu schweren Komplikationen mit einem generalisierten Magen-Darm Befall, einer Herpes simplex-Sepsis und einer häufig tödlich verlaufenden Meningoencephalitis. HSV-2 verursacht fast ausschließlich die Infektion der Genitalorgane und der Analschleimhaut. Die Sepsis und die Meningoencephalitis des Neugeborenen ist ebenfalls häufig durch HSV-2 verursacht. Die Infektion der Haut, Augen und Mundschleimhaut wird fast ausschließlich durch HSV-1 ausgelöst (NASEMANN, 1979; LENNARTZ, 1979).
Die sekundäre Manifestation ist definiert als das typische klinische Erkrankungsbild bei vorhandenen spezifischen Serumantikörper (Serumnarbe) (NASEMANN, 1979). Es handelt sich dabei kausal um eine endogene Reinfektion oder eine exogen abgeschwächte Neu- bzw. Zweitinfektion ohne lokale Lymphadenitis von ca. 3 bis 10 Tagen Dauer. Die häufigste sekundäre klinische Manifestation stellt ein Herpes labialis, Herpes genitalis und ein Herpes keratitis dar.
Die Häufigkeit der latenten Virusträger wird von GERMER, 1959 auf 60 %, von NASEMANN, 1979 auf 70 bis 90 % und von WOLLENSAK, 1966 auf 70 bis 80 % geschätzt. Dem Rezidiv geht fast immer ein typischer individueller Triggermechanismus voraus. Folgende auslösende Umstände sind beschrieben worden:

Fieber (eher HSV-1, da HSV-2 bei 30°C thermolabil ist, (LENNARTZ, 1979))
UV-Strahlen
Traumen (mechanisch oder chemisch)
Menstruation
Allergien
Durchfälle
Streß (psychisch)

Nach LENNARTZ, 1977 sind zwei formale Mechanismen für die endogene Rezidiventstehung denkbar.

1. Eine geringe kontinuierliche Virusreplikation ist in den Speicheldrüsen und Tränendrüsen vorhanden. Infiziert werden die Epithelzellen nach einer physikalischen oder chemischen Alteration (KAUFMANN, 1968).

2. Alle Viren der Herpes-Gruppe zeigen eine Organotropie für Nervenzellen (GOODPASTURE, 1929). In der Latenzphase wird in den Nervenzellen vom Ganglion Gasseri (HSV-1) und im Sakralganglion (HSV-2) sogenanntes nacktes HSV-Genom durch Wirtszellen-Nucleasen gehemmt. Die Nervenzelle reagiert auf endogene und exogene Reize mit einer Bildung von Nucleaseninhibitoren. Komplette Virone können dadurch ausgebildet werden.

Die sich zunächst nur auf tierexperimentelle Untersuchungen (STEVENS, 1971) stützende Theorie der latenten neurotropen Infektion der afferenten sensorischen Ganglien und ihrer Fortsätze ist durch autoptische Studien von BARINGER und SWOVELAND, 1973; BARINGER, 1974; BASTIAN et al., 1974 auch für den Menschen gezeigt worden. WARREN et al., 1979 wies die latente HSV-Infektion im Ganglion cervicale superior und im Ganglion ciliare des Nervus vagus beim Menschen nach. In autonomen Ganglien soll ein Triggermechanismus durch die lokale Applikation von Sympathomimetika bestehen (MINTSIOULIS et al., 1979).

Ca. 5 % der Pat. einer Augenklinik werden wegen der direkten oder indirekten Folgen einer Herpes simplex-Infektion des Auges behandelt (LENNARTZ, 1979).

W. GRÜTER konnte 1920 als erster die Infektionsgenese der von EMMERT, 1885 zuerst beschriebenen Keratitis dendritica

tierexperimentell durch den Nachweis des Herpes simplex-Virus zeigen. Die Koch'schen Postulate der Definition einer Infektionskrankheit wurden dann von GUNDERSEN, 1936 erfüllt. In 74 % konnte er HSV nach tierexperimenteller Inokulation von menschlichen Hornhautabradaten bei einer Keratitis dendritica in vitro nachweisen. Die Nachweisgrenze einer bis zu 4 Tagen alten klinischen Manifestation liegt mit den heutigen Methoden bei ca. 80 % (NAHMIAS et al., 1979).

Die Manifestation der Herpes simplex-Infektion am Auge kann primär oder sekundär sein und tritt am häufigsten in der Kindheit auf. Ein Geschlechtsunterschied besteht in der Kindheit nicht. Aber es erkranken mehr erwachsene Männer als Frauen an okulären Herpes simplex-Infektionen. HSV-1 wird in 99,9 % als Erreger der Infektion in der Kindheit und im Erwachsenenalter gefunden, während bei Neugeborenen in 80 % ein okulärer Herpes durch HSV-2 induziert wird. Bei Neugeborenen handelt es sich fast ausschließlich um eine peripartale Infektion, wobei es zu einer Inokulation des HSV-2 während der Geburtskanalpassage kommen soll (WOLLENSAK, 1979).

Klinisch findet sich eine einseitige Blepharitis oder Blepharokonjunktivitis. Selten kommt es zu einer akuten follikulären Konjunktivitis mit einem mononukleären Exsudat mit oder ohne bläschenförmigen periorbitalen Hautbefall. Die Keratokonjunktivitis des Neugeborenen ist eine schwere oft mit einer Meningoencephalitis tödlich verlaufende Infektion. Sehr selten sieht man eine Conjunktivitis cicatriadis. Bei der primären Manifestation findet sich zusätzlich eine lokale Lymphadenitis und im Stadium der Virämie dann auch Fieber. Die Beteiligung der Hornhaut beginnt mit einer Hypästhesie. Danach entsteht eine Herpes corneae vesicularis (von Horner) mit flüchtigen traubenförmig angeordneten Bläschen. Daraus entwickelt sich häufig die 1885 von EMMERT beschriebene Form der Keratitis

dendritica (Übersicht bei BIETTI, 1971).

Nach WOLLENSAK, 1975 kann die herpetische Hornhauterkrankung in folgende klinisch morphologische Entitäten eingeteilt werden.

1. Oberflächliche Keratitis (Keratitis punctata, stellata, dendritica).
   Komplikation: Stromale Keratitis per continuitatem mit Zerstörung der Bowmann'schen Membran.

1.1 Geographisches oder amöboides Hornhautulcus
   Komplikation: Narbige Defektheilung, Descemetocele, Perforation, sekundäre bakterielle Superinfektion.

1.2 Indolentes oder metherpetisches Hornhautulcus
   (bei fehlendem Virusnachweis: Trophisches Ulcus)
   Ca. 17 % der Spontanverläufe (GUNDERSEN, 1936).

1.3 Interstitielle Keratitis, sogenannte sekundäre tiefe Keratitis
   (bei teilweise geschlossener Hornhautepitheldecke)

2. Primäre tiefe Keratitis (Keratitis disciformis)
   (kausal: Autoimmunmechanismus als Epiphänomen nach Viruskontakt)

Nach der ersten klinischen Manifestation einer okulären HSV-Infektion findet sich in ca. 25 % ein Rezidiv innerhalb von 2 Jahren. Bestehen anamnestisch 2 oder mehr Manifestationen erhöht sich die Rezidivwahrscheinlichkeit auf 50 % in einem Zeitraum von 2 Jahren (LENNARTZ, 1974). Im Vergleich dazu liegt die Rezidivquote eines Herpes labialis bei 30 % innerhalb eines Jahres, während die Wahrscheinlichkeit auf 50 % ansteigt, wenn anamnestisch mehr als 1 Rezidiv bekannt ist.

Die Beurteilung der Effizienz einer antiherpetischen Therapie ist durch den hohen Anteil von Spontanheilungen erschwert. So fand VAN BIJSTERVELD und POST, 1980 eine Spontanheilungsquote von 20 % bei einer komplikationslosen Abheilung der Keratitis superficialis, während KAUFMANN, 1966 über eine Quote von 7 bis 58 % in einer klinischen Doppelblindstudie berichtete. EY et al., 1964 sah einen spontanen Heilungsverlauf bei nahezu 60 % innerhalb von 2 Wochen. Nach 2 Wochen fand dann annähernd eine Heilung in 100 % "sui generis" statt.

Das allgemein akzeptierte Behandlungskonzept der superfiziellen Keratitis herpetica ist das vorsichtige vorgenommende Debridgement des infizierten Epithels und die adjuvante Gabe von Mydriatika.
WOLLENSAK, 1979 empfiehlt die partielle mechanische Wischabrasio mit 5 % Jodlösung und berichtet über eine 80 %ige Erfolgsquote in ca. 3 Tagen. SUNDMACHER, 1976 hat mit der partiellen thermomechanischen Abrasio eine Erfolgquote von 67 % innerhalb von 2-3 Tagen, die innerhalb von 7 Tagen auf 80 % ansteigt. Von den in 20 % übereinstimmend gesehenen Therapieversagern stellen die Frührezidive den weitaus größten Anteil. WOLLENSAK, 1979 empfiehlt das Debridgement ebenfalls beim geographischen oder amöboiden herpetischen Hornhautulcus als Primärtherapie nach Absetzen der in 96 % der Fälle erfolgten Cortison-Therapie.

Die medikamentöse Therapie mit Chemotherapeutika hat seit 22 Jahren sowohl als primäre wie auch als Zusatztherapie einen breiten Stellenwert in der Behandlung der herpetischen Augenkrankheit eingenommen.

Nachdem WEYGAND et al., 1952 den Einbau von 5-Bromuracildesoxyribose (BUdR), dem ersten halogenierten Pyrimidinanalogon, anstelle von Thymidin in die DNS von Bakterien mit anschließender Wachstumshemmung nachweisen konnten wurde nach weiteren Antimetaboliten gesucht. NEWTON und

TAMM, 1959 berichten über eine ausgeprägte Hemmung von Herpesviren in vitro durch 5-Joddesoxyuridin (WOLLENSAK, 1966). WOLLENSAK, 1961 diskutierte als erster in Europa die Möglichkeit einer spezifischen virustatischen Therapie des Herpes corneae durch Pyrimidinanaloga. KAUFMANN, 1962 berichtete nach tierexperimentellen Studien über die ersten klinischen Erfolge mit 5-Joddesoxyuridin (IDU) in der Therapie der Keratitis herpetica superficialis. IDU ist ein gut untersuchtes, breit angewendetes Medikament (s. Tab. 1). In 6 klinischen Doppelblindstudien fand sich eine ca. 70 %ige Erfolgsquote nach 8 bis 11 Behandlungstagen bei alleiniger Therapie einer neu aufgetretenen Keratitis dendritica mit IDU und eine Erfolgsquote von ca. 50 % bei einem rezidivierten Herpes corneae (Übersicht bei SUNDMACHER, 1976).

Von der lokalen Therapie mit Antimetaboliten sind über folgende Nebenwirkungen und Komplikationen in der Ophthalmologie berichtet worden:

1. Therapieversagen
   - resistente Herpesvirusstämme
   - Virusreboundphänomene mit Spätrezidiv
   - Frührezidive
   - Uveitis

2. Regenerationshemmung (epithelial, stromal)
   - Defektheilung (Narbe)
   - Perforationen (Überbehandlungsulcus)

3. Epitheldysplasien

4. Erosive Epitheliopathien
   - toxisch

Zahlreiche Nebenwirkungen und Komplikationen treten unter der Behandlung mit IDU auf (s. Tab. 1). KAUFMANN, 1975 bezeichnet heute die von ihm selbst eingeführte Substanz als "obsolet" in der Therapie des Herpes corneae. Mit 5-Trifluor-2'-desoxyuridin (F3TdR, TFT) führte KAUFMANN, 1964 einen weiteren Thymidinantimetaboliten nach überzeugenden tierexperimentellen Ergebnissen in die klinischen Herpestherapie ein. TFT wird im Gegensatz zu IDU nicht in die RNA anstelle von Uracil eingebaut, sondern hemmt teilweise kompetitiv die Thymidinkinase, Thymidilatsynthetase und DNA-Polymerase. Die Substanz wird in die DNA kompetitiv anstelle von Thymidin-Triphosphat inkorporiert (HEIDELBERGER, 1979).

In 4 klinisch kontrollierten Doppelblindstudien zeigte sich eine bessere Abheilungstendenz im Vergleich von TFT zu IDU sowohl bei der Therapie der Keratitis superficialis als auch beim amöboiden Ulcus. Die Versagerquote lag nach einer 14-tägigen TFT-Therapie einer oberflächlichen Keratitis superficialis herpetica bei 4 %, während sie beim IDU bei 16 % lag. Bei der Therapie des amöboiden Ulcus lag die Versagerquote beim TFT unter gleichen Bedingungen bei 2 % im Gegensatz zu 59 % beim IDU (Übersicht bei HEIDELBERGER und KING, 1979; CARMINE et al., 1982). In den experimentellen und klinischen Studien wurden weniger schwerwiegende Nebenwirkungen gesehen (Tab. 1). In der Behandlung von IDU-resistenten HSV-Keratitiden zeigt TFT gute Erfolge. Es wird in 1 % der Fälle mit TFT-resistenten HSV gerechnet (FALCON et al., 1977). TFT ist heute das klinische Standardchemotherapeutikum des Herpes corneae.

PAVAN-LANGSTON und DOHLMANN, 1972 berichteten von der erfolgreichen klinischen Anwendung eines neuen Purinmetaboliten Adenine arabinoside (ARA-A), den KAUFMANN, 1965 schon tierexperimentell im Vergleich mit IDU untersucht hatte und keine bessere Wirkung fand. ARA-A wird von zellulären Kinasen phosphoryliert und ist als Triphosphat ein

selektiver Inhibitor der DNA-Polymerase. Ein geringer Anteil wird in die virale DNA eingebaut (WHITLEY et al., 1980).

Zwischen TFT und ARA-A fand sich in mehreren kontrollierten klinischen Studien kein Unterschied im Abheilungserfolg bei der Behandlung der superfiziellen Keratitis herpetica (COSTER et al., 1976; VAN BIJSTERFELD und POST, 1980; TRAVOS und PETTERSEN, 1978).

Bei der Behandlung des geographischen Ulcus fand COSTER et al., 1978 eine signifikant bessere Abheilung unter 1 %igen TFT-Tropfen als unter 3 %iger ARA-Salbe. Das Virusreboundphänomen tritt bei subklinischen Dosierung signifikant häufiger unter einer ARA-A Therapie auf (COSTER, 1979).

Ein weiterer Nachteil ist die geringe Wasserlöslichkeit der Substanz. ARA-A erreicht lokal appliziert nur in Salbenform therapeutische Spiegel. Eine epitheliale Regenerationshemmung wird unter ARA-A nicht beobachtet (FOSTER und PAVAN-LANGSTON, 1977).

JONES et al., 1979 berichteten über die ersten klinischen Studien mit einem selektiven Purinmetaboliten (9-2 (2-hydroxyethoxymethyl)guanin, Acyclovir (ACV)).

Acyclovir wird 40-100fach schneller in den HSV-infizierten Keratozyten von der viralen Thymidinkinase zum Monophosphat phosphoryliert, als in den nicht infizierten Zellen durch die zelluläre Kinase. Danach wird die Substanz über den zellulären Weg zu Acyclovirtriphosphat phosphoryliert und hemmt spezifisch die Virus induzierte DNA-Polymerase (SCHAEFFER, 1982).

Im Gegensatz zu IDU, TFT und auch ARA-A, das trotz der geringen Wasserlöslichkeit prinzipiell wegen seiner niedrigen Toxizität klinisch auch systemisch hätte angewandt werden können, ist Acyclovir das erste uneingeschränkt systemisch anwendbare Virustatikum mit einer hohen Spezifität für HSV und Variezellen-Zoster-Infektionen.

In einer ersten kontrollierten klinischen Doppelblindstudie zeigte sich bei der superfiziellen Keratitis

herpetica mit 87 % im Gegensatz zu 82 % kein Unterschied in der Abheilung zwischen 3 %iger ACV-Salbe und 2 %iger TFT-Salbe. Unter beiden Pharmaka fand sich bis zu 70,6 % eine Keratitis punctata als Nebenwirkung (LAU et al., 1982). Das Ergebnis einer vergleichenden Studie über den Therapieerfolg bei dem amöboiden Ulcus steht noch aus. Von toxischen Nebenwirkungen auf das Immunsystem oder auf die Hämopoese, von teratogene oder mutagene Nebenwirkungen ist bis jetzt nicht berichtet worden. Die corneale Regeneration soll nicht beeinflußt sein (LASS et al., 1979).

Eine neue therapeutische Möglichkeit zur Behandlung der latenten rezidivierten HSV-Infektionen ist durch die systemische Gabe im Keratitis-Infektionsmodell der Maus gezeigt worden. PAVAN-LANGSTON et al., 1979 konnten die latente Infektion des Ganglion gasseri durch die systemische tägliche Gabe von 60 mg/kg/KG ACV in Abhängigkeit von der postinfektiösen Latenzphase, der Dosis und der Applikationshäufigkeit senken. Sie fanden nach 3-wöchiger Latenzphase bei einer 5-tägigen, 10-tägigen und 15-tägigen Therapie eine Reduktion des Virus von 0 %, 77 % und 88 % der Fälle. Bei systemischer ARA-A-Gabe war noch in 60 % Herpesvirus im Gewebe nachweisbar.

Die Interferone als physiologisch gebildete antivirale Proteine, insbesondere das Interferon alpha, haben als Monosubstanz in der Therapie des Herpes corneae nicht die erwarteten Erfolge gezeigt (SUNDMACHER, 1981). In Kombination mit 1 %igen TFT-Tropfen fand sich bei der superfiziellen Keratitis herpetica in einer kontrollieren Studie eine Abheilungsbeschleunigung von 6.5 auf 3.3 Tage (49 %) für die partielle Abheilung (Epithelschluß) und von 11.3 auf 6.6 Tage (42 %) für die komplette Abheilung (KONNING et al., 1982).

Auch die Kombinationtherapie von TFT und pepsingespaltenen F(ab)2-Fragmenten des IgG-Herpesantikörpers scheint bes-

sere Therapieerfolge als die Monosubstanz zu erbringen (ZIRM, 1980).

Von einer neuen Substanzgruppe den Phosphonoacylverbindungen bzw. Phosphatanaloga, die in vitro spezifisch die Virus induzierte DNA-Polymerase hemmen sollen, liegen bis jetzt nur tierexperimentelle Ergebnisse über die Therapie des Herpes corneae vor. Für Phosphonoameisensäure (PFA), Phosphonoessigsäure (PAA) und Phosphonoproprionat ist eine Hemmung der Virus-DNA-Polymerase in vitro übereinstimmend nachgewiesen worden. PFA und PAA zeigen im Keratitis-Infektionsmodell des Kaninchens eine signifikant bessere Abheilung des Herpes corneae im Vergleich zu Placebo. Der Einfluß auf die corneale Regenerationshemmung ist bis jetzt noch nicht untersucht worden. Beide Substanzen sollen eine niedrige zelluläre Toxizität besitzen, obwohl stärkere Hautreaktionen und vereinzelt erosive Keratopathien unter der Therapie von 5 %igen PAA-Tropfen beobachtet wurden.

Eine vergleichende tierexperimentelle Studie über die epitheliale corneale Regenerationshemmung zwischen PFA, PAA und TFT ist bis jetzt in der Literatur noch nicht mitgeteilt worden.

Die Ergebnisse von Studien über die cornealen Regenerationshemmung von TFT sind widersprüchlich.
HOLTMANN und STEIN, 1977 sowie FOSTER und PAVAN-LANGSTON, 1977 fanden keine Hemmung der epithelialen Regeneration unter 1 %igen TFT-Tropfen bei achtmaliger täglicher Applikation über 8 Tage. Dagegen berichtet LERCHE et al., 1972 über eine signifikante Hemmung der epithelialen Regeneration unter 2 %iger TFT-Salbe bei gleich langer Therapiezeit. BREWITT und FEUERHAKE, 1981 berichten über eine Hemmung der epithelialen Regeneration unter der Therapie mit 1 %igen TFT-Tropfen bei 12maliger täglicher Applika-

tion. Histologisch fanden sich die Zeichen der toxischen Zellschädigung.

In dieser vergleichenden Studie soll die Hemmung der epithelialen Regeneration und die mögliche zytotoxische Wirkung der Phosphatanaloga PFA, PAA sowie 2 neuer Phosphonoacylverbindungen N2825 (N5) und N2826 (N6) im Vergleich zu der klinischen Referenzsubstanz TFT in unterschiedlichen Konzentrationen bzw. unterschiedlicher Galenik untersucht werden.

Tab. 1

Herpes cornea Virustatika in der Klinik

Substanz	Applikation	Dosis	Wirkungsmechanismus	klinische Erfolgsquote
5-Jod-2'-desoxyuridine (IDU)	0.1 %-Tropfen 0.2 %-Tropfen (lokal)	bis 19 x tgl.	Einbau in die RNA; quasi-irreversible Hemmung der Thymidilatsynthetase (Heidelberger, 1965)	Therapiedauer: 8-11 Tage ca.70% bei primärer Keratitis dendritica ca.50% bei rezidivierendem Herpes corneae (Übersicht bei Sundmacher, 1976)
5-Trifluor-2'-desoxyuridin (F3TdR, TFT)	1 % Tropfen 2 % Salben (lokal)	1 Tr./2 Std. (max.9Tr/Tg) bis zum Epithelschluß, danach 1Tr/4Std. (Minimum 5Tr/Tg) für 7 Tg.bis max. 21 Tg.	Hemmung der zellulären Thymidinkinase, Thymidilatsynthetase, DNA-Polymerase; Einbau in die Virus-DNA und Zell-DNA (Heidelberger, 1979)	Therapiedauer: 14 Tage ca. 96% bei der Keratitis dendritica ca. 75%-98% beim amöboiden Ulcus (Heidelberger und King, 1975)
Adenine arabinoside (ARA-A)	3 % Salbe (lokal) (i.v. möglich)	6 x tgl.	selektive competitive Hemmung der DNA-Polymerase; Einbau in die virale DNA (Whitley et al., 1980)	Therapiedauer: 7-14 Tage ca. 96 % bei Keratitis dendritica ca. 76 % bei amöboiden Ulcus (Coster et al., 1975)
9-2(2-hydroxyethoxy-methyl guanin, Acyclovir (ACV)	3 % Salbe (lokal, i.v)	5 x tgl.	Phosphorylierung durch die virusinduzierte Thymidinkinase; selektive Hemmung der virusinduzierten DNA-Polymerase	Therapiedauer: 1 Tag ca. 87 % bei Keratitis dendritica amöboides Ulcus?

Nebenwirkungen

10-20 % primäre Resistenz (McGill et al., 1976)
Virusreboundphänomen (Jawetz et al., 1965)
Perforation (Wollensak, 1960)
Abdruckartige Hornhautnarben (Burns, 1963)
Therapieresistente Uveitis (Wollensak, 1966)
Follikuläre Konjunktivitis)
Kontaktallergie) (Sundmacher, 1976)
Obturation des Punctum lacrimale inferior)
Regenerationshemmung des Epithels und Stromas (Payrau, 1964; Wollensak und Kypke, 1965)

---

1 % primäre Resistenz (Falcon et al., 1977)
Virusreboundphänomen (Hyndiuk et al., 1978)
Erosive Epitheliopathia punctata (Falcon et al., 1981)
Regenerationshemmung
- epitheliale (Brewitt und Feuerhake, 1981; Lerche et al., 1979)
- stromal (Foster und Pavan-Langston, 1977; Gasset und Katzian, 1975)
Epitheldysplasie (Maudgal et al., 1978)
Kontaktdermatitis (Pavan-Langston und Foster, 1977; Cirkel und van Ketel, 1981)
Epitheliale Microzysten (Hyndiuk et al., 1978)
Epitheliales Ödem)(Coster et al., 1976; Sugar et al., 1980)
Filamentäre Keratitis)
Obturation des Punctum lacrimale inferior (Travers und Patterson, 1978)
Akute konjunktivale Ischämie (Falcon et al., 1981)

---

keine

---

erosive Keratopathia punctata (Lau et al., 1982)

---

2. Regeneration des Hornhautepithels

Das menschliche Hornhautepithel besteht aus 5 bis 6 Schichten eines nicht verhornenden Plattenepithels. Der Durchmesser liegt zwischen 30 und 50 µm (Übersicht bei ROHEN, 1964; SCHWARZ, 1971; TENG, 1961 und 1962).
Die basale Zellschicht besteht aus kubisch geformten apikal abgerundeten, an der Basis flachen Matrixzellen mit einem runden bis ovalen der Basalmembran abgewandten Zellkern mit 1 bis 2 Nucleolen.
Die sich anschließende 2 bis 3 schichtige intermediäre Zellschicht wird von polygonalen, nach außen konvexen Flügelzellen mit zentralen runden, zur Oberfläche parallel angeordneten Kernen gebildet. Es schließen sich 2 Schichten von sehr flachen Zellen an, die an der Oberfläche zahlreiche Microplicae und Microvilli von 0.05 x 0.2 µm ausbilden. Danach folgt die osmophile Mukoproteinschicht des Tränenfilms.
Durch Desmosomen, die in den 3 unteren Schichten vermehrt vorhanden sind, wird ein Zellverband mit relativ gleichen Interzellularspalten von 100 bis 200 A° gebildet. Die basale Zellschicht ist in einem Abstand von 0.3 µm durch Hemidesmosomen von 0.1 µm Länge im mittleren Teil der Cornea an der Basalmembran fixiert. Zusätzlich bilden sich gelegentlich sogenannte Wurzelfüßchen mit Desmosomen aus (SCHWARZ, 1971).
Neben den Epithelzellen gibt es in den peripheren Anteilen der basalen Zellschicht pigmentierte Melanozyten und vorwiegend zentral in der Intermediärschicht Riesenzellen mit langen dendritischen Ausläufern. Diese sogenannten Langerhanschen Zellen sind als Gewebsmakrophagen dem histiozytären System zuzuordnen (GILETTE et al., 1982).

Der Mitoseindex liegt im ruhenden humanen Corneaepithel nach radiographischen Untersuchungen von HANNA et al., 1961 in einer Beobachtungszeit von 2 Stunden bei ca. 1

Mitose auf 60 Basalzellen. Die Zellteilung erfolgt ausschließlich in der basalen Zellschicht und zeigt eine örtliche Häufung. BUSCHKE, 1949 fand 1 Mitose auf 250 basale Zellen mit einer Zellteilungszeit von 1 Stunde in histologischen Untersuchungen. Die niedrigste Mitoserate findet sich in der Hornhautperipherie, die höchste in den mittleren Corneaanteilen. Das Epithel im Corneazentrum hat eine durchschnittliche Mitoserate. FOLGLE et al., 1980 fanden zwischen den zentralen und peripheren Corneaanteilen beim Kaninchen keinen Unterschied in der Mitosezahl. Für die meisten Tierspezies fanden sich ähnliche Miteseraten. BUSCHKE et al., 1943 sowie FRIEDENWALD und BUSCHKE, 1944 fanden eine stimulierende Wirkung von Sympathomimetika auf die Mitoserate. FOLGLE et al., 1980 konnte an der Kaninchenhornhaut zeigen, daß ein circadianer Miteserhythmus mit einem hohen Mitoseindex zwischen 5 h und 9 h morgens, bzw. ein niedriger Mitoseindex zwischen 3 h und 23 h abends besteht. Sie fanden keinen steuernden Einfluß des sympathischen Nervensystems oder von Sympathomimetika auf die circadiane Rhythmik.

Die normale Transitzeit der Epithelzelle soll 3 1/2 bis 7 Tage betragen (HANNA und O'BRIEN, 1960). In Anlehnung an tierexperimentelle Befunde schätzt HANNA et al., 1961 den "Turn-Over" des humanen Corneaepithels auf ca. 1 Woche.

Ein wesentlicher anatomischer Unterschied zwischen der Hornhaut des Kaninchens und des Menschen ist das Fehlen der Bowmann'schen Membran. Zusätzlich findet man eine höhere Nucleolenzahl in der basalen Zellschicht und nach außen breiter werdende Interzellularräumen (TENG, 1961).

In den klassischen lichtmikroskopischen Untersuchungen von FRIEDENWALD und BUSCHKE, 1944, BUSCHKE, 1949 und HEYDENREICH, 1958 wurden 2 grundlegende Mechanismen der epithelialen Wundheilung beschrieben: Die Migration und die sich anschließende Proliferation des Epithels.

PETERS berichtete als erster 1885 über die Möglichkeit der unabhängigen amöboiden Bewegung der cornealen Epithelzelle. SALZER, 1912 interpretierte die freie Fortbewegung der Epithelzelle als Folge eines proliferativen Vorganges. BUSCHKE, 1949 beschrieb einen Zusammenhang zwischen der Ausbildung von Pseudopodien und der anschließenden amöboiden Zellbewegung von basalen cornealen Epithelzellen. Er faßte formal die autonome Zellmigration in den beiden unteren Zellagen des Corneaepithels als Beginn der epithelialen Regeneration auf. Nach den übereinstimmenden lichtmikroskopischen Untersuchungen der oben genannten Autoren beginnt die Migration 1 Stunde nach der oberflächlichen Corneaverletzung und endet mit dem vollständigen Epithelschluß, wobei die Wunde durch ein einzelliges Epithel aus extrem flachen Zellen bedeckt ist.

Die Proliferationsphase beginnt einige Stunden später. Zunächst findet sich eine gesteigerte mitotische Aktivität am Wundrand und in dem etwas weiter entfernt liegenden intakten Epithel. Nach zwei bis drei Tagen sieht man Mitosen im Wundepithel. Die Proliferationsphase endet mit der anatomischen Wiederherstellung der Epithelschichten und der Epitheldicke. Die physiologische Exfoliation der oberen Zellschicht beginnt erst nach der vollständigen funktionellen Wiederherstellung des Epithels (BUSCHKE, 1949; HEYDENREICH, 1958; BUSCHKE et al., 1943; FRIEDENWALD und BUSCHKE, 1944).

Die Mitoserate während der epithelialen Regeneration war lange Zeit umstritten. BUSCHKE, 1943 fand eine ansteigende Mitoserate nach 96 Stunden bei größeren Läsionen aber schon nach 4 Stunden bei kleineren Wunden. AREY und COVODE, 1943 sahen einen sinkenden Gesamtmitoseindex nach einer Epithelabrasio, der langsam wieder anstieg und am 4. postoperativen Tag den physiologischen Normalwert übertraf. SMELSER und OZANICS, 1944 fanden keine Änderung der Gesamtmitosenzahl bei epithelialen Wunden.

Durch Anwendung der Autoradiographie, die gegenüber der normalen lichtmikroskopischen Untersuchung eine 30fach

höhere Sensibilität zum Nachweis von Zellmitosen hat (HANNA, 1966), konnten die Vorgänge in der Proliferationsphase genauer untersucht werden. HARA, 1962 fand nach einer Epithelabrasio einen Mitosestopp an den Wundrändern. Nach 24 Stunden fand sich eine gesteigerte Mitoseaktivität in den zu der Wunde migrierenden basalen Zellen. Nach 5 Tagen normalisierte sich der Mitoseindex. In einer umfangreichen Studie mit einer verbesserten autoradiographischen Technik fand HANNA, 1966 einen sinkenden Mitoseindex in dem wundnahen Epithel, während die etwas entfernteren Basalzellen eine vermehrte Mitosezahl nach der Epithelabrasio aufwiesen. Es zeigte sich weiter, daß nicht nur die basalen Zellen, sondern alle wundnahen Zellen migrieren. Zellen der oberen Epithelschicht zeigten keine Mitosen im Gegensatz zu den in die Wunde migrierenden Zellen der basalen Schicht. Die Mitosewelle beginnt peripher der hydropisch geschwollenen Zellen des Wundrandes. Die mitotische Aktivität dieser Zellen ist allerdings gering, so daß der Gesamtmitoseindex bei kleinen epithelialen Wunden nicht verändert ist. Ein entscheidender Faktor zu der Induktion der mitotischen Aktivität soll die erhaltene Zellspannung sein (HANNA, 1966).

Biochemische Untersuchungen, die Transmissionselektronenmikroskopie und die Rasterelektronenmikroskopie haben in den letzten Jahren die Bedeutung der Zellmigration ganz in den Vordergrund der epithelialen Regeneration gestellt (BREWITT, 1979; KHODADOUST et al., 1968; CINTRON et al., 1981; HENNINGHAUSEN et al., 1981, SRINIVASAN und EAKINS, 1979).

Nach einer partiellen Epithelabrasio kommt es am Wundrand zu einer Retraktion, Schwellung und Dissoziation des Epithelverbandes. Nach ca. 1 Stunde bildet sich ein zarter, leicht erhabener Wundrand mit ineinander verschobenen flachen Zellen aus. Möglicherweise werden so die basalen Zellen gegen Toxine abgeschirmt (BREWITT, 1979). Auf der

stellenweise nicht mehr intakten Basalmembran läßt sich mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz nach einer Stunde eine kräftige Fibrinschicht und eine zarte Fibronectinschicht nachweisen. Das Fibrin bleibt nur bis zu 2 Wochen nachweisbar, während das Fibronectin mit einem Maximum nach 8 Stunden noch bis zu 2 Monaten nachweisbar ist (FUJIKAWA et al., 1981). Elektronenmikroskopisch finden sich größere Fibrinnetze durchsetzt mit zahlreichen polymorphkernigen Leukozyten des Tränenfilms 3 bzw. 6 Stunden nach der Abrasio bis 38 Stunden am Wundrand zwischen der Basalmembran und den unteren Zellagen. Ebenfalls finden sich einzelne sogenannte Surface-Fibrininseln mit vernetzten Leukozyten auf der abradierten Corneaoberfläche (PFISTER, 1975).

Die erste Phase der Zellmigration beginnt ca. 1 Stunde nach der Zellschwellung durch die fortschreitende starke Wasseraufnahme am Wundrand. Trotz der resultierenden Zelloberflächenvergrößerung und Verstreichen der Mikrovilli bleibt der Interzellularraum gleich groß (CINTRON et al., 1981). Im Vergleich dazu findet sich bei einer Hautwunde eine Zellvergrößerung bis zu 4 mm vom Wundrand entfernt (WINSTANLEY, 1976).

Nach 15 Stunden kommt es zu einer extremen Abflachung der Zellen am Wundrand. An der nun einsetzenden Migration nehmen alle Zellagen teil (PFISTER, 1975; CINTRON et al., 1981). Es bilden sich neue grobe Membranfalten, fingerartige Fortsätze (Filopodien) und sogenannte Membrankrausen aus, die parallel auftretenden zarten Membranfalten entsprechen.

In dieser Transitionsphase bildet sich eine 2 bis 3-zellige Epithelschicht mit einer sich zungenförmig vorschiebenden basalen Zellschicht, aus der Filopodien Kontakt mit dem Fibrin-Fibronectinnetz der Basalmembran aufnehmen (PFISTER, 1975). Nach 24 Stunden findet man zahlreiche Filopodien, die kontraktile Elemente enthalten sollen, mit einer stärkeren parallelen Ausrichtung sowie zahlreichen Membrankrausen. Der Proteingehalt der regenerierenden

Zellen ist zu diesem Zeitpunkt stark erhöht (CINTRON et al., 1981). Die Enzyme des Pentosephosphatcyclus zeigen eine hohe Aktivität. Der Glukosespiegel ist um 1/5 gesunken, während das Laktat stark ansteigt. ATP, der Quotient aus ATP und ADP/2 sowie der Summe der Adenosinphosphate ist erhöht, so daß ein allgemein erhöhter Energieumsatz im regenerierenden Epithel besteht (HENNINGHAUSEN et al., 1971).

Nach 42 Stunden findet sich eine 2 mm breite, führende Monolayerschicht von basalen Zellen, auf die eine 2 bis 3-schichtige Multilayerschicht von 85 % Dicke des normalen Corneaepithels folgt (CINTRON et al., 1981). Diese migrierende Schicht zeigt normal weite Interzellularspalten mit intakten Desmosomen. Sie besteht aus großen, vorwiegend runden Zellen, wie es in vivo von LANG und MC FARLAND, 1981 mit Hilfe der Spektralmikroskopie gezeigt werden konnte. Autoradiographische Studien zeigten, daß dieser Zellverband ohne wesentliche Umschichtung und Neuanordnung weiter migriert (BREWITT, 1979; CINTRON, 1981).

Nach 48 Stunden erhöht sich der DNA-Gehalt in dem Restcorneaepithel nach der Abrasio um ca. 35 % und steigt langsam über den physiologischen Normalwert eines intakten Epithels. Nach 10 Tagen wird der Normalwert wieder erreicht. Da der Anteil der Zellproliferation nach den Untersuchungen von HANNA, 1966 und GIPSON, 1981 in der Migrationsphase klein ist, scheint der DNA-Anstieg durch hinzumigrierendes Epithel von peripheren Corneaanteilen zu stammen (CINTRON et al., 1981).

Eine 6 mm durchmessende epitheliale Wunde ist durch die alleinige Migration nach 55 Stunden geschlossen. Die vollständige anatomische Wiederherstellung der Epitheldecke mit Mikroplicae und Mikrovilli sowie einem intakten Tränenfilm soll nach 144 Stunden erfolgt sein (PFISTER, 1975). Ein 7 mm durchmessender epithelialer Defekt soll nach 10 Tagen vollständig anatomisch wieder hergestellt sein (CINTRON et al., 1981).

Zwei bis drei Tage nach der vollständigen Epithelialisierung beginnt zeitlich die 3. Phase der Regeneration die Reetabilisierungsphase von 2 bis 3 Tagen Dauer (KHODADOUST et al., 1968). In dieser Phase kommt es bei intakter Basalmembran zur fortschreitenden Ausbildung von Hemidesmosomen zwischen den basalen Zellen und der Basalmembran und von weiteren Desmosomen. Ein 48 Stunden alter Epithelverband ist sehr leicht durch geringe mechanische Kräfte von der Basalmembran als Streifen abhebbar, während er die gleiche Zugfestigkeit wie normales Corneaepithel hat (SRINIVASAN und EAKINS, 1979). Nach Ausbildung von Hemidesmosomen findet sich die gleiche Adhäsivität in dem regenerierten Epithel wie bei normalen Corneaepithel. Ist die Basalmembran zerstört oder das Stroma durch Verletzungen entblößt, erfolgt nach der Epithelisierung in einem Zeitraum bis zu 6 Wochen keine Ausbildung von solchen Zellstrukturen zum Stroma (KHOUDADOUST et al., 1968).

3. Virustatika

3.1 Trifluorthymidin (TFT, F3TdR)

3.1.1 Struktur und Pharmakokinetik

Die Synthese des Trifluorthymidin (5-Trifluormethyl-2'-desoxyuridin, F3TdR) einem Thymidinanalogon (Abb. 1) war HEIDELBERGER 1962 gelungen (HEIDELBERGER, 1962 und 1964). In einer wässrigen Lösung ist TFT bei Zimmertemperatur in einem pH-Bereich von 3-4 stabil (NESTLER und GARRET, 1968).

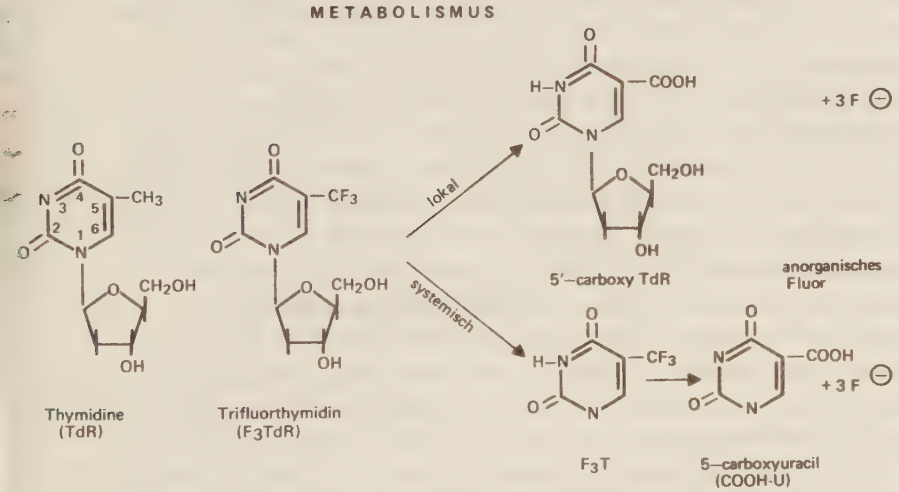


Abb.1 Strukturformel und Metabolismus des Thymidinanalogon: Trifluorthymidin (TFT, F_3 TdR).

Unter physiologischen in vitro-Bedingungen (gepufferte Ringerlösung, pH 7.6, 34°C) zerfällt 18 bis 25 % der Substanz innerhalb von 2 Stunden in das einzige in vitro und vivo nachweisbare Abbauprodukt 5-Carboxy-2'-desoxyuridin (Abb. 1) durch Hydrolyse (O'BRIEN und EDELHAUSER, 1977; CLOUGH et al., 1978). 5-CarboxyTdR soll noch eine geringe antivirale Restwirkung haben (PAVAN-LANGSTON und NELSON, 1973). Ein zellulärer Katabolismus des TFT konnte an isoliert perfundierten Hornhäuten nicht nachgewiesen werden (CLOUGH et al., 1978; O'BRIEN und EDELHAUSER, 1977). TFT ist gut wasserlöslich wie auch fettlöslich (COLLINS und BAUER, 1977). DEXTER et al., 1972 fanden bei systemischer Applikation im menschlichen Organismus eine Halbwertszeit von 18 Minuten und einen Katabolismus von F3TdR durch Abspaltung des Zuckeranteils zur freien Base F3T und anschließender Oxidation zu 5-Carboxyuracil (Abb.1), welches als nicht toxisches pharmakologisch unwirksames Endprodukt im Urin ausgeschieden wird. In der oben erwähnten Studie von O'BRIEN und EDELHAUSER, 1977 konnte gezeigt werden, daß TFT wie auch IDU und Vidarabine (ARA-A) in freier Diffusion mit einer linearen Kinetik in Abhängigkeit von der Konzentration transcorneal penetriert. Bei fehlendem Corneaepithel verdoppelt sich die Penetrationsrate von TFT und IDU, während sich die des ARA-A verfünffacht, wobei die Nettopenetrationsrate bei gleicher Ausgangskonzentration von TFT insgesamt unabhängig von der Beschaffenheit des Corneaepithels am größten ist. Nach 3 Stunden fand sich das identische Fließgleichgewicht zwischen F3TdR und dem Hydrolysat 5-CarboxyTdR bei intaktem und fehlendem Corneaepithel auf der epithelialen, wie auch auf der endothelialen Seite. Hieraus folgerten O'BRIEN und EDELHAUSER, 1977, daß erstens kein aktiver Transport und zellulärer Metabolismus stattfindet, daß zweitens die Hydrolyse von F3TdR vom pH und der Ionenkonzentration im umgebenden Milieu abhängt und daß drittens keine Barriere in vitro für die transcorneale Penetration des F3TdR existiert. O'BRIEN et al., 1981 zeigten, daß die

Funktion und Struktur des Endotheliums von in vitro mit TFT perfundierten Kaninchenaugen bei intrazellulären Konzentrationen von 10^{-4} bis 10^{-3} mol nicht beeinflußt wird. Erst bei einer 60fach höheren Konzentration von Fluorionen, die bei der Hydrolyse der halogenierten Pyrimidinnukleotide entstehen, wird die Oxidation der Glukose im Pentosephosphatzyklus zu 60 % kompetitiv gehemmt.

Tierexperimentell konnte eine transcorneale Penetration von F3TdR an intakten Kaninchenaugen nicht nachgewiesen werden (SUGAR et al., 1973). Ebenfalls konnten PAVAN-LANGSTON und NELSON, 1979 an 5 Patienten, die 4 Tropfen 1 % TFT 30 Minuten vor einer Hornhauttransplantation wegen tiefer Herpeskeratitiden erhielten, kein F3TdR im Kammerwasser nachweisen. Übereinstimmend fanden POIRIER et al., 1982 bei 9 Patienten mit klinisch intaktem Corneaepithel nach 5maliger Applikation von 1 % TFT Tropfen in Abstand von 30 Minuten bis 5 Minuten vor einer Kataraktoperation weder TFT noch den Metaboliten 5-CarboxyTdR bei einer Nachweisgrenze von 2 umol (0.1 mg/l) im Kammerwasser. Im Gegensatz dazu konnte unter gleichen Bedingungen eine Penetration von 3 % Acyclovir-Salbe im Kammerwasser in 95 % der Fälle mit antiherpetisch relevanten Hemmkonzentrationen im Kammerwasser gemessen werden. Auch CARMINE et al., 1982 wiesen weder TFT noch 5-CarboxyTdR im Serum von gesunden Normalpersonen nach, die 14 Tage lang täglich 7 Applikationen von 1 % TFT Tropfen erhielten.
Dagegen konnte in dem Kammerwasser von Herpes-infizierten Kaninchenaugen und bei 4maliger Applikation von 1 % TFT Tropfen im Abstand von 10 Minuten bis 5 Minuten vor einer Keratektomie an nicht intaktem menschlichen Corneaepithel eine ungleiche Penetration von TFT nachgewiesen werden. Es wurden Konzentrationen von 3.1 bis 43.9 umol gemessen. 5-CarboxyTdR wurde nicht nachgewiesen (PAVAN-LANGSTON und NELSON, 1979).

3.1.2 Pharmakodynamik

F3TdR wird über den "Salvage-Pathway" durch die Thymidinkinase zu F3TMP phosphoryliert und hemmt gleichzeitig kompetitiv dieses Enzym (WIGDAHL und PARKHURST, 1978). F3TMP hemmt irreversibel das "Targetenzym" der monofluorinierten Pyrimidine, die Thymidilatsynthetase, welches das Schlüsselenzym (HARRAP und RENSHAW, 1980) der De-Novo Synthese der Pyrimidinnucleotide ist (DE CLERCQ et al., 1978; REYES und HEIDELBERGER, 1965). Nach weiterer Phosphorylierung durch die Enzyme Thymidilatsynthetase und Nucleosiddiphosphatkinase hemmt F3TTP kompetitiv sowohl die zelluläre wie auch die virusinduzierte DNA-Polymerase und wird kompetitiv anstelle von TTP in die replizierte DNA inkorporiert (Abb. 2), (TONE und HEIDELBERGER, 1972). Im Gegensatz zu IDU wird F3TdR nicht in die zelluläre oder Virus-RNA eingebaut (HEIDELBERGER, 1977).

Die Inkorporation von F3TTP in die DNA des Vaccinavirus (FUJIWARA und HEIDELBERGER, 1970), Bacteriophage T4 (GOTTSCHLING und HEIDELBERGER, 1963) und in Säugetierzellen (FUJIWARA et al., 1970) ist übereinstimmend gezeigt worden. Die Aufnahme des F3TdR in die DNA von Vaccinaviren, die auf HELA-Zellkulturen gezüchtet wurden, führte zu morphologisch defekten, nicht mehr infektiösen Virionen und falscher Transcription der "späten m-RNA" bei einem Einbau von ca. 2 % F3TTP in die virale DNA (DEXTER et al., 1973; FUJIWARA und HEIDELBERGER, 1970; OKI und HEIDELBERGER, 1971). Die Einbaurate des F3TTP ist wesentlich größer bei der DNA von Vaccina-Virus als bei der DNA von nicht infizierten HELA-Zellkulturen, was ein wichtiges Merkmal für die chemotherapeutische antivirale Spezifität der Substanz ist (HEIDELBERGER 1977). Vermutlich werden nicht normale Virionenproteine synthetisiert (HEIDELBERGER und KING, 1979). Diese molekularbiologischen Vorgänge konnten bis jetzt nicht in aller Klarheit für das Herpes

simplex-Virus nachgewiesen werden, obwohl offensichtlich der gleiche molekulare Wirkmechanismus für F3TdR vorhanden zu sein scheint (HEIDELBERGER und KING, 1979).

O'BRIEN, 1979 konnte an unbehandelten regenerierenden cornealen und konjunktivalen Epithel in vitro zeigen, daß 85 % des zellulär inkorporierten F3TdR phosphoryliert wird, wobei ca. 2/3 als F3TTP vorliegen. 3 % des gesamten F3TdR wird in die zelluläre DNA eingebaut, was 40 % des insgesamt zu 22 % eingebauten Thymidindeoxyuridin (TdR) entspricht. Nur ca. 1.2 % der gesamten zellulären Uridine fanden sich in der DNA. FUJIWARA et al., 1970 fanden einen Einbau von 25 % des F3TdR in die zelluläre DNA von HELA-Zellkulturen. HEIDELBERGER et al., 1965 konnte nur Spuren in der DNA von Leber, Milz und Darmzellen bei systemischer Applikation von F3TdR im Tierexperiment nachweisen.

In zahlreichen experimentellen Studien wurde für TFT eine ED_{50} von 0.2 µg/ml (0.6 umol) bis 1.7 µg/ml (4.9 umol) für HSV-1 in verschiedenen Zellkulturen mit unterschiedlichen Methoden gefunden (COLLINS und BAUER, 1977 a, b; DE CLERCQ et al., 1978 b, 1979 und 1980). CIN et al., 1976 und PRUSOFF et al., 1977 fanden eine 98,5 % Reduktion im Plaquereduktionstest für HSV 1 auf Vero-Zellkulturen bei einer Konzentration von 17 µg/ml (50 µmol). HSV 2 zeigte in vitro die gleiche Sensibilität für F3TdR, obwohl eine größere Variation unter den einzelnen Stämmen vorhanden sein soll (COLLINS und BAUER, 1977 a, b; DE CLERCQ et al., 1980). COLLINS und BAUER, 1977 a, b fanden zwei nicht sensible HSV-2 Stämme unter 5 untersuchten, die bis zu der maximalen, nicht toxischen Konzentration von 27 µg/ml (80 µmol) keine Hemmung zeigten. Dagegen sprechen die Ergebnisse von DE CLERCQ et al., 1980 der bei 7 untersuchten HSV-2 Stämmen eine identische Sensibilität für T3TdR fand. In Zellkulturen, die das Enzym Thymidinkinase enthalten,

lag die ED_{50} bei 0.02 µg/ml (0.6 µmol) bis 17 µg/ml (50 µmol) bei einer ca. 3-tägigen Inkubation (PARKHURST et al., 1976; UMEDA und HEIDELBERGER, 1968; PRUSOFF et al., 1977; CHENG et al., 1975). In Zellkulturen ohne dieses Enzym lag die ED_{50} bei 675 µg/ml (200 µmol) bis 16880 µmol/ml ($5x10^4$ µmol) (PARKHURST et al., 1976; WIGDAHL und PARKHURST, 1981; UMEDA und HEIDELBERGER, 1968). Das Vorhandensein der Thymidinkinase limitiert weitgehend den zytotoxischen Effekt des F3TdR (WIGDAHL und PARKHURST, 1981). Die therapeutische Breite des F3TdR liegt nach DE CLERQ et al., 1980 zwischen 0.01 µg/ml und 40 µg/ml. Während eine Konzentration von 0.01 µg/ml (0.03 µmol) nach 16-stündiger Inkubation den Einbau von markierten Desoxyuridin zu 50 % hemmt, kommt es erst bei einer Konzentration von 40 µg/ml nach 3-4 Tagen zu morphologisch nachweisbaren Zellstrukturänderungen an Nierenzellkulturen der Ratte (DE CLERCQ et al., 1980).

Die chemotherapeutische Spezifität des F3TdR wird in vitro-Testungen unterschiedlich beurteilt. DE CLERQ et al., 1978 b; UMEDA und HEIDELBERGER, 1969 fanden eine niedrige antiviral wirksame Konzentration im Vergleich zu den zytotoxischen Konzentrationen, während CHENG et al., 1975, LIN et al., 1976, PARKHURST et al., 1976 und PRUSOFF et al., 1977 bei gleicher Konzentration einen ähnlichen hemmenden antiviralen wie auch zytotoxischen Effekt sahen. DE CLERQ et al., 1979 und 1980 fanden eine ED_{50} für HSV-1 von 0.7 µg/ml, für Vaccina-Virus von 0.2 µg/ml und eine ED_{50} von 0.01 µg/ml für das verwendete Zellsystem, so daß sie eine negative Selektivität vermuteten.

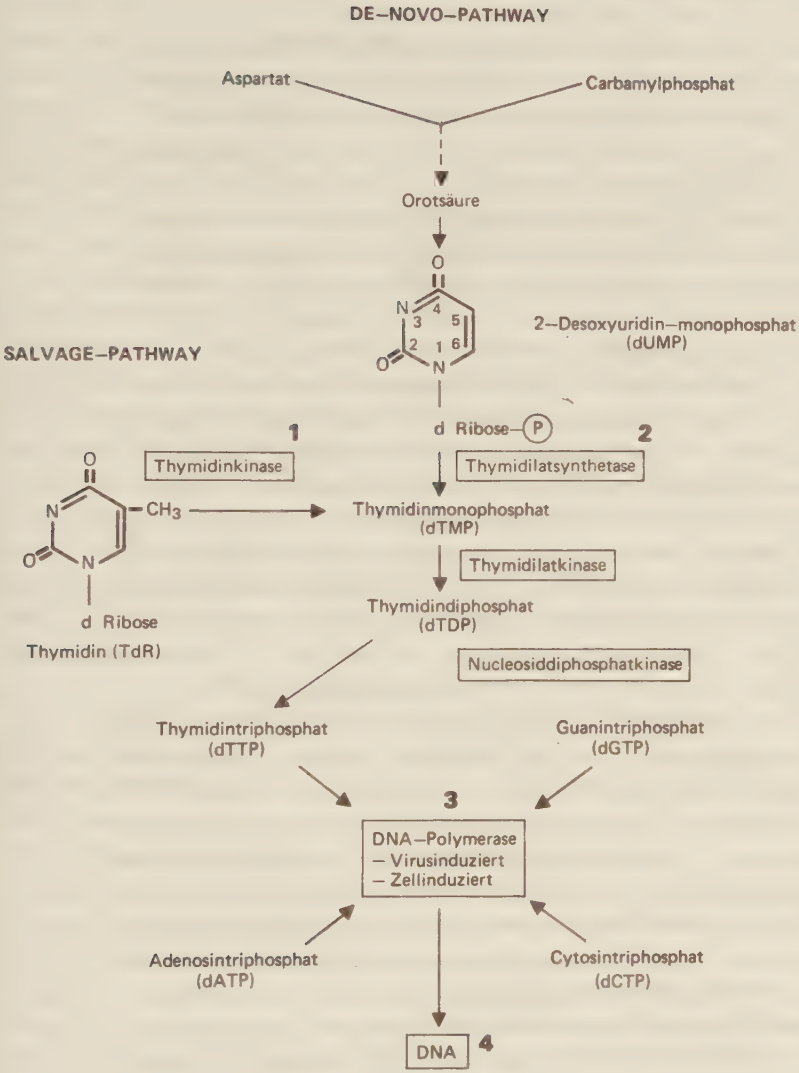


Abb.: 2 Stoffwechsel und Einbau von Thymidin in die DNA

1–4: Angriffspunkte der Thymidinanaloga in den Stoffwechsel

3.1.3 Experimentelle und klinische Studien

KAUFMANN in Zusammenarbeit mit HEIDELBERGER berichtete 1964 als erster darüber, daß F3TdR eine viel wirkungsvollere Substanz in der Behandlung der experimentell am Kaninchenmodell erzeugten Keratitis dendritica herpetica im Vergleich zum IDU ist. Ebenfalls fand sich eine gute Wirkung bei IDU-resistenten HSV-1-Stämmen und eine gute Wirksamkeit bei Vaccina-Virus-induzierten Keratitis. In einer weiteren tierexperimentellen Studie fand KAUFMANN, 1965 eine deutlich bessere Wirkung des F3TdR bei gleicher Konzentration gegenüber von Joddesoxyuridin (IDU), Bromo-2'-desoxyuridin (BDU) und Cytosine arabinoside (ARA-C). F3TdR eliminierte HSV-1 innerhalb von 2 Tagen unter einer fortlaufenden 2-stündigen Applikation von 1 %igen TFT in Puffer. Wurde die Therapie nach 7 Tagen unterbrochen, fand sich nach 18 Stunden erneut Herpesvirus in der Cornea. Es kam zu einem schnellen Titeranstieg von nachweisbaren Viren. Der Titer lag im Mittel höher als in der Kontrollgruppe und es wurden partiell Reinfektionen beobachtet. Wurde kontinuierlich durchgehend 14 Tage lang therapiert, fand sich kein Reboundphänomen (KAUFMANN, 1965). In der ersten kontrollierten multizentrischen Doppelblindstudie zwischen IDU und TFT, in der 78 Patienten mit einer Keratitis herpetica dendritica und einer Keratitis geographica eingingen, fand sich nach einer 2-wöchigen Therapie mit 5 täglichen Applikationen von 1 % F3TdR bzw. 0.1 %igen IDU eine signifikant kürzere Abheilzeit von 6.3 Tagen gegenüber 8.2 Tagen und eine signifikant niedrigere Versagerquote von 8 % gegenüber 40 % für F3TdR (WELLINGS et al., 1972). Nebenwirkungen wurden nicht beobachtet.
3 weitere kontrollierte klinische Studien sind durchgeführt worden (LAIBSON et al., 1977; PAVAN-LANGSTON und COSTER, 1977; SUGAR et al., 1980).
PAVAN-LANGSTON und COSTER, 1977 fanden bei einem kleineren Kollektiv (n=39) mit einer höheren Dosis von 9 täglichen

Applikationen von 1 % TFT gegenüber 19 täglichen Applikationen von 0.1 % IDU eine signifikant niedrigere Versagerquote von 4 % für TFT gegenüber 37 % für IDU bei annähernd gleichen Abheilzeiten von 5.3 bzw. 5.5 Tagen. Es wurden jeweils in 2 Fällen minimale subjektive Irritationen und eine Keratitis punctata als Nebenwirkung beobachtet.
Die Studie von LAIBSON et al., 1977 bestätigte die Ergebnisse weitgehend. Es wurden allerdings in 19 % der Fälle unter der TFT-Therapie gegenüber 18 % bei der IDU-Therapie eine oberflächliche Stromaschädigung bei der Abheilung beobachtet.
SUGAR et al., 1980 konnten zeigen, daß es unter einer 1 % F3TdR-Therapie mit 4 Applikationen über 2 Wochen bei 8 % der Patienten mit einer Keratitis dendritica herpetica im Gegensatz zu 17 % der IDU therapierten Augen nicht zu einer Abheilung kam. Unter dem gleichen Therapieschema kam es bei 25 % der TFT therapierten Augen mit einer Keratitis geographica nicht zu einer Abheilung gegenüber von 66 % in der IDU-Gruppe. Die Abheilzeiten für die "Responser" lagen bei ca. 6 Tagen. Die Ergebnisse waren allerdings nicht signifikant.

In mehreren Studien ist die Wirkung von F3TdR gegenüber Adenine arabinoside (ARA-A) verglichen worden (PAVAN-LANGSTON und DOHLMAN, 1972; PAVAN-LANGSTON, 1979; COSTER et al., 1976 und 1979; VAN BIJSTERVELD und POST, 1980). Tierexperimentell zeigte 3 % ARA-A-Salbe die gleiche Wirkung wie 0.1 % IDU-Tropfen und 1 % TFT-Tropfen, während 3 % ARA-Tropfen nur gegenüber der Placebogruppe eine gering bessere Wirkung zeigte (PAVAN-LANGSTON et al., 1979). Eine 3 % Tropfenlösung von ARA-AMP (Vidarabinemonophosphat) soll die gleiche therapeutische Wirkung wie eine 3 % ARA-A-Salbe haben während 10 % ARA-AMP tierexperimentell im Vergleich zu den anderen Substanzen eine bessere Wirkung zeigte (PAVAN-LANGSTON et al., 1976). COSTER et al., 1976; VAN BIJSTERVELD und POST, 1980 fanden in 2 kontrollierten klinischen Studien an insgesamt 144 Patien-

ten keinen Unterschied zwischen 1 % TFT-Tropfen und 3 % ARA-A-Salbe in der Abheilzeit und den 'Non-Responsern'. Es wurden keine nennenswerten Nebenwirkungen beobachtet. In der Folgestudie von 30 Patienten mit einem amöboiden cornealen Ulcus fand COSTER et al., 1979 eine größere Erfolgsquote von 85 % unter 1 % F3TdR im Gegensatz zu 76 % unter 3 % ARA-A-Salbe. Bei 7 Patienten kam es während der Behandlung zu einer Keratitis punctata, wovon 4 Patienten mit 1 % TFT behandelt wurden.

MC GILL et al., 1976 berichteten als erste über die klinische Behandlung der IDU-resistenten Keratitis dendritica herpetica mit 1 % TFT und fanden im Mittel eine Abheilzeit von 5.6 Tagen. GILBERT und WARH, 1980 fanden bei 5 Patienten mit einem IDU-therapieresistenten amöboiden cornealen Ulcus eine mittlere Abheilzeit von 15 Tagen bei 6 Applikationen von 1 % TFT. Es wurden keine Nebenwirkungen beobachtet. HYNDIUK et al., 1978 beobachtete bei 10 Patienten mit einer IDU bzw. ARA-A-resistenten Keratitis dendritica unter einer 14-tägigen 2-stündlichen Applikation von 1 % TFT-Tropfen im Mittel nach 6.1 Tagen eine komplikationslose Abheilung. Bei 2 Patienten kam es nach 1 Woche zu einer Reinfektion im Sinne eines Virusreboundphänomens. Unter der gleichen Therapie kam es dann zur endgültigen Abheilung. Bei einem dieser Patienten zeigte sich am 22. Tag eine Keratitis punctata sowie kleine kristalline Ablagerungen in den Epithelzellen. Nach einem therapiefreien Zeitraum von 10 Tagen waren die Nebenwirkungen nicht mehr zu beobachten. MC KINNON et al., 1975 berichteten über 3 Reinfektionen bei 30 therapierten Patienten. MC GILL et al., 1974 fanden keinen statistischen Unterschied in der Zahl der Reinfektionen zwischen einer IDU und TFT-Therapie. In einer retrospektiven klinischen Sammelstatistik ergab sich eine Inzidenz für die Therapieresistenz von 1 % bei 363 mit TFT-behandelten Augen, von 7 % bei 164 mit ARA-A-behandelten Augen und von 14 % von 534 mit IDU-behandelten Augen (FALCON et al., 1977). Zwischen 3 % Acyclovirsalbe und 2 % TFT-Salbe konnte in

einer kontrollierten Doppelblindstudie (n=59) kein signifikanter Unterschied in der Behandlung der Keratitis dendritica hinsichtlich der Heilungsrate und der Abheilungszeit gefunden werden. In beiden Therapiegruppen trat in ca. 70 % eine Keratitis punctata nach 1 Woche auf (LAU et al., 1982).

3.1.4 Toxikologie und Nebenwirkungen

Unter der Therapie mit 1 % TFT Tropfen bei 9 Applikationen pro Tag über 3 Wochen fanden sich in einer retrospektiven Studie (363 Patienten) in 4 % klinische Zeichen der Toxizität im Corneaepithel oder im Corneastroma. In 3 % wurde eine Hypersensivitätsreaktion der periorbitalen Haut beobachtet. Unter einem vergleichbaren therapeutischen Regime fanden sich bei einer IDU-Therapie (534 Patienten) in 10 % lokale toxische Nebenwirkungen und in 7 % Hypersensitivitätsreaktion. Unter einer Vidarabin-Therapie (164 Patienten) kam es in 4 % zu toxischen Nebenwirkungen und in 1 % der Fälle zu einer Hypersensitivitätsreaktion (FALCON et al., 1977). In den klinischen pharmakologischen Teststudien fand sich ein vorübergehendes subjektives Brennen und Stechen nach der Installation von TFT-Tropfen in den Bindehautsack in 4,6 % und ein Lidödem in 2,8 % der Fälle (BURROUGHS, WELLCOME). MC GILL et al., 1974 berichteten über das Auftreten einer Keratitis punctata (erosive Epitheliopathie) bei einer täglichen Applikationsrate von 5x1 Tropfen 1 % TFT. Ähnliche Beobachtungen machten COSTER et al., 1976 und 1979 in einer großen klinischen Studie sowie LAU et al., 1982, die bei 70 % der mit 1 % TFT Tropfen behandelten Pat. nach ca. 7 Tagen Therapie bei weitgehend abgeheilter herpetischer Hornhautläsion eine Keratitis punctata fanden. 3 Patienten entwickelten zusätzlich eine ausgeprägte konjunktivale Hyperämie. Nach Absetzen der Therapie waren die Veränderungen innerhalb kurzer Zeit nicht mehr nachweisbar. HYNDIUK et

al., 1978 berichteten von 10 Patienten mit einer IDU-resistenten Keratitis herpetica, bei denen nach 4-wöchiger fortlaufender Therapie mit 1 % TFT eine Keratitis punctata mit einem epithelialen Ödem und zarten linearen kristallinen epithelialen Einschlüssen auftrat, was nach Absetzen der Therapie vollständig reversibel war. Nach FALCON et al., 1981 sollen die TFT-induzierten punktförmigen Epitheliopathien immer nach Absetzen der Therapie reversibel sein.

Während MC GILL et al., 1974 b und SUNDMACHER, 1978 keine Nebenwirkungen unter einer 3-monatigen TFT-Therapie mit mittleren Dosierungen beschrieben, berichteten MAUDGAL et al., 1983 über das Auftreten von schweren ausgedehnten cornealen Epitheldysplasien bei 3 älteren Patienten, die eine 6x Applikation von 1 % TFT Tropfen/Tag bis zu 6 Monaten wegen rezidivierten Herpeskeratiden erhalten haben. Weiterhin sind einzelne Fälle von einer akuten ischämischen konjuntivalen Reaktion (FALCON et al., 1981), Obturation des Tränenkanals (TRAVARS und PETTERSON, 1978), filamentäre Keratitis, eines Augenlidödems und einer allergischen Konjunktivitis sowie einer Hypersensitivitätsreaktion berichtet worden (COSTER et al., 1976; SUGAR et al., 1980). PAVAN-LANGSTON und FOSTER, 1977 berichteten über einen Fall mit einer schweren Blepharodermatitis nach 48 Stunden einer üblichen klinischen TFT-Therapie von 5x1 % Tropfen/Tag. CIRKEL und VAN KETEL, 1981 berichten über einen Fall mit einer allergischen Kontaktdermatitis bei dem eine Kreuzhypersensitivität mit IDU vorlag, was sonst sehr selten sein soll (MC GILL et al., 1974 a). Bei beiden Patienten war anamnestisch eine allergische Disposition bekannt.

In kontrollierten tierexperimentellen Studien zur Frage der Regenerationshemmung (KAUFMANN, 1965) und in den tierexperimentellen Wirkungsstudien (KAUFMANN und HEIDELBERGER, 1964 und 1965) fand sich bei einer kontinu-

ierlichen 2 stündlichen Applikation von 1 % TFT Tropfen über 8 Wochen keine toxische Nebenwirkung des Medikaments. HOLTMANN und STEIN, 1977 fanden keine Regenerationshemmung nach mechanischer oder chemischer Epithelabrasio im Kaninchenmodell bei sechsmaliger Applikation von 1 % TFT-Tropfen. Ebenfalls sahen LERCHE et al., 1979 keine Hemmung der Stromaregeneration unter 2 % TFT Salbe bei achtmaliger täglicher Applikation. Allerdings zeigte sich histologisch in dem basalen Epithelzellen stärker pyknotische Kerne bei einem mäßigen Zellödem, was auf eine toxische Zellschädigung hinwies. In histologischen Untersuchungen wurde von PAVAN-LANGSTON und FOSTER, 1977 von einer ähnlichen toxische Zellschädigung berichtet. Sie fanden eine zur Kontrolle signifikant erniedrigte stromale Reißfähigkeit nach achtmaliger täglicher Applikation von 1 % TFT Tropfen. BREWITT und FEUERHAKE, 1981 sahen eine Regenerationshemmung nach einer superfiziellen Keratektomie und 12maliger täglicher Applikation von 1 % TFT Tropfen im Kaninchenmodell. Unter einer sechsmaligen täglichen Applikation wurde keine epitheliale Regenerationshemmung beobachtet. Morphologisch zeigten die migrierenden Epithelzellen der Therapiegruppe bei 12maliger Applikation eine deutliche Reduzierung der Mikrostruktur der Zelloberfläche, partielle Aufbrüche der Zellmembran und Zellnekrosen in der rasterelektronenmikroskopischen Untersuchung.

In vitro-Testsysteme lassen eine hohe Mutagenität von F3TdR vermuten (CASSIMAN et al., 1981). AEBERSOLD, 1979 sowie HUBERMANN und HEIDELBERGER, 1972 fanden allerdings keine erhöhte Mutagenität im Tierexperiment.
Das onkogene Potential von F3TdR ist wenig untersucht. JONES et al., 1976 konnten an Mäuseembryozellen keine onkogene Transformation nachweisen. 1 % TFT-Tropfen in einer Dosis von 4x2 Tropfen führte bei schwangeren Kaninchen nicht zu einer höheren fetalen Mißbildungsrate im Gegensatz zu 0.1 %igen IDU, wenn es vom 6. bis 18. Schwangerschaftstag appliziert wurde (HUI et al., 1975).

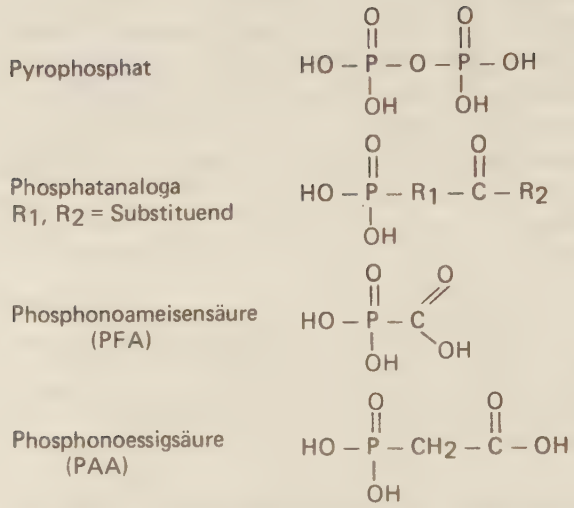


Abb. 3
Strukturformel der Phosphatanaloga PAA und PFA

3.2 Phosphonoessigsäure (PAA)

3.2.1 Struktur und Pharmakokinetik

Die in der Natur nicht vorkommende Phosphonoessigsäure (PAA) wurde 1924 von Nylen synthetisiert (NYLEN, 1924). Die Strukturformel der Substanz zeigt Abb. 3. Das Molekulargewicht beträgt 139 Dalton. Die Substanz ist wasserlöslich, sehr stabil und bildet mit 2- bzw. 3-wertigen Kationen in Abhängigkeit vom pH-Wert und Ionenmilieu feste Komplexe. Die pKa-Werte in ionenfreier wässriger Lösung sind:

pK1 = 2.3 (P-OH)
pK2 = 5.4 (COOH)
pK3 = 8.6 (P-OH) (BOEZI, 1975).

Im physiologischen Milieu liegt PAA als 2-wertiges Anion vor.
Die Substanz wird im Stoffwechsel bei systemischer Applikation unverändert im Urin und Faeces ausgeschieden. Ein sehr geringer Anteil wird im Knochen abgelagert (BOPP et al., 1977). Über die Pharmakokinetik von Phosphonoessigsäure bei lokaler cornealer Anwendung ist noch nicht berichtet worden.

3.2.2 Pharmokodynamik

SCHIPKOWITZ et al., 1973 berichteten als erste über die Hemmung der Replikation von HSV-1 und 2 durch PAA. Der molekulare Wirkungsmechanismus scheint in einer nicht kompetitiven Hemmung der DNA-Polymerase an der Pyrophosphatbindungsstelle des Enzyms zu liegen (MAO und ROBISHAW, 1975; LEINBACH et al., 1976; NEWTON, 1979; ERIKSSON, 1982).
Zunächst wurde nur über eine selektive Hemmung der Herpesvirus induzierten DNA-Polymerasen von HSV-1 und 2 berichtet (MAO und ROBISHAW, 1975). NEWTON, 1979 fand in vitro mit 1-2 µmol PAA eine 50 %ige Hemmung der isolierten Virus-DNA-Polymerase. In infizierten Zellkulturen lag die 50 %ige Hemmungskonzentration der Virusreplikation bei 50-200 µmol (KERN et al., 1977; OVERBY, 1977). Keine Enzymhemmung durch PAA wurde in vitro für die beta-DNA-Polymerase der Säugetierzelle, der DNA-Polymerase von E.coli, von viraler RNA-Polymerase und reversen Transkriptase gefunden (MAO und ROBISHAW, 1975). Nach neueren Untersuchungen scheint PAA alle Virus-induzierten DNA-Polymerasen der Herpesgruppe spezifisch zu hemmen (Übersicht bei BOEZI, 1979; NEWTON, 1979).
BERGER et al., 1979 fanden eine Hemmung der DNA-Synthese in Zellkulturen von stimulierten menschlichen Lymphozyten bei äquimolaren PAA-Suspensionen. Nach einer 24-stündigen Inkubation mit 0.5 mmol und mit 5 mmol fand sich eine

30 %ige bzw. 63 %ige Hemmung. In den üblichen Zellkulturen zeigte sich nach kurzer Inkubation keine stärkere Hemmung. Da die Aufnahme vom radioaktiv markierten PAA eng mit der DNA-Synthesehemmung korrelierte und sich kein Unterschied in der Hemmbarkeit von der isolierten DNA zeigte, schien die zelluläre Proliferationshemmung von der unterschiedlichen Substanzaufnahme abzuhängen (BERGER et al. 1979). LAUDEN und BERTINO, 1978 sowie SABOURIN et al., 1978 fanden übereinstimmend, daß die zellulären DNA-Polymerasen alpha, beta und gamma aus unterschiedlichen tierischen und menschlichen Zellkulturen durch niedrige Konzentrationen (30 µmol) zu 50 % gehemmt wurden. Die zelluläre menschliche DNA-Polymerase alpha soll nach LAUDEN und BERTINO, 1978 mit den gleichen Konzentrationen von PAA wie die Herpes-induzierte DNA-Polymerase hemmbar sein. Dagegen fand SABOURIN et al., 1978 eine 15 bis 30fach geringere Sensitivität der DNA-Polymerase alpha. Für die DNA-Polymerasen beta und gamma zeigte sich eine 70fach geringere Sensitivität. Enzymkinetische Analysen zeigten, daß eine nicht kompetitive Hemmung der DNA-Polymerase alpha in Abhängigkeit von PAA und den Nucleotridtriphosphaten als Substrat auftritt.

3.2.3 Experimentelle Studien

Nachdem SCHIPKOWITZ, 1973 als erster über die Wirksamkeit von PAA bei der Keratitis herpetica im Kaninchenmodell publiziert hatte, sind 3 tierexperimentelle Vergleichsstudien zwischen PAA und IDU durchgeführt worden (GERSTEIN et al., 1975; MEYER et al., 1976; CORDON et al., 1977). STREISSLE, 1979 berichtet über eine vergleichende tierexperimentelle Studie von PAA und ARA-A. GAURI, 1979 teilte Ergebnisse über eine tierexperimentelle Studie mit PAA in einem polychemischen Therapieverfahren mit. Über die Ergebnisse einer klinischen Studie mit PAA ist bis jetzt in der Literatur noch nicht berichtet worden.

SCHIPKOWITZ, 1973 fand für 1 %, 2 % und 5 % PAA Salbe sowie für 5 % PAA Tropfen bei 8maliger stündlicher Applikation pro Tag am 5. und 6. postinfektiösen Tag eine signifikant bessere Abheilung der Keratitis herpetica dentritica im Vergleich zum Placebo im Kanincheninfektionsmodell. GERSTEIN, 1975 sah eine signifikant bessere Abheilung unter 5 % PAA Salbe und 5 % PAA Tropfen am 7. und 10. postinfektiösen Tag gegenüber der Kontrollgruppe in einer größeren virologisch kontrollierten tierexperimentellen Studie. Auch unter 2 % PAA Salbe kam es offensichtlich zu einer besseren Abheilung. Das Ergebnis war nicht signifikant. In der 5 % PAA Tropfengruppe wurde 8mal im stündlichen Abstand und 1x nachts 5 % PAA-Salbe appliziert, während in der 5 % PAA Salbengruppe nur 4x täglich appliziert wurde.

Zwischen 5 % PAA Salbe und 0.5 % IDU Salbe fand sich hinsichtlich der Abheilung und der Viruspräsens kein signifikanter Unterschied. Ein gering besseren Verlauf der experimentellen Herpeskeratitis zeigte sich unter 5 % PAA Salbe (GERSTEIN, 1975). Dies Ergebnis wurde in einer ähnlich konzipierten Studie von MEYER et al., 1976 bestätigt. Es konnte kein Unterschied zwischen 5 % PAA Tropfen und 0.1 % IDU Tropfen bei kontinuierlicher 2-stündlicher Applikation sowie zwischen 5 % PAA Tropfen und 5 % PAA Salbe bei 4maliger Applikation pro Tag gefunden werden.

5 % PAA Tropfen im Vergleich zu 1 % TFT Tropfen zeigten bei der IDU-resistenten Keratitis herpetica keinen Unterschied in der Abheilung. Beide Therapiegruppen wiesen eine signifikant bessere Abheilung gegenüber der Kontrollgruppe auf. Bei der experimentell erzeugten Keratitis herpetica zeigte sich keine Wirkung von lokal applizierter 5 % PAA Salbe, während die tägliche intravenöse Applikation von PAA (150 mg/kg/KG) bzw. die subkonjunktivale PAA Applikation von 100 mg/Tag und die 6x tägliche Applikation von 5 % TFT Tropfen im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikant bessere Abheilung zeigte. Die Therapiegruppen unterschieden sich im Abheilungsverhalten voneinander

nicht (MEYER et al., 1975). GORDON et al., 1977 konnte in einer kontrollierten tierexperimentellen Studie zeigen, daß zwischen 5 % PAA Salbe und 0.5 % IDU Salbe sich eine signifikant bessere Abheilung hinsichtlich der Kontrollgruppe fand, daß aber der quantitative Virusnachweis in den PAA-behandelten Augen am 5. Behandlungstag signifikant niedriger war. Am 3. Tag nach dem Therapieende wurden in beiden Gruppen ein Virusreboundphänomen beobachtet. In den PAA-behandelten Augen war diesmal ebenfalls signifikant weniger HSV-1 nachweisbar. Ein Virusreboundphänomen wurde ebenfalls von GERSTEIN et al., 1979 beobachtet.
STREISSLE, 1979 fand keinen Unterschied zwischen 3 % PAA Tropfen und 3 % ARA-A Salbe in der Abheilung der tierexperimentellen Keratitis herpetica. Beide Abheilungsverläufe waren signifikant besser gegenüber der Kontrollgruppe.
GAURI, 1979 fand eine bessere Abheilung unter PAA als unter Deoxy-D-Glukose und in der Kombination mit ARA-A eine gering bessere Abheilung als unter alleiniger ARA-A-Therapie.

3.2.4 Toxikologie und Nebenwirkungen

Die LD_{50} für PAA liegt bei Nagern bei 500 mg/kg/Tag. Unter der halbierten Dosis traten keine toxischen Nebenwirkungen auf (FITZWILLIAM und GRIFFITH, 1976). Beim Kaninchen fanden sich schwere tödliche tetanische Muskelspasmen bei einer intravenösen Applikation von 300 mg/kg/Tag (MEYER et al., 1976). BOEZI, 1979 fand bei Affen eine Leberdegeneration, eine ulzerative Dermatitis, eine Gingivitis und Veränderungen der Fellfarbe bei Applikation hoher intravenöser PAA-Dosen.
PAA soll nicht mutagen sein (BECKER et al., 1976). Über die Frage der Carcinogenität ist bis jetzt nicht berichtet worden.
Während anfangs über keine morphologische Veränderung der

Kulturzellen oder Hemmung der Zell-DNA, RNA und Proteinsynthese durch PAA berichtet wurde (MAO et al., 1975; OVERBY et al., 1974; LEE et al., 1976), zeigten sich unter höheren Konzentrationen von 200 bis 1000 µmol schwere zytotoxische Veränderungen und eine Hemmung des Zellwachstums und der DNA-Synthese (HUANG, 1975; NYORMOI et al., 1976). Über einen Teilungsstillstand in der Interphase von Lymphoblasten-Kulturen wurde von NYORMOI, 1976 berichtet. HAY et al., 1977 fanden eine mutierte, transformierte Zellinie, die unter hohen PAA-Konzentrationen Zellklone ausbildete. Eine völlige Wachstumshemmung von Mäusezellkulturen fand NEWTON, 1979 bei einer Konzentration von 200 µmol. Bei PAA-Konzentrationen von 100-200 µmol fand er eine partielle Wachstumshemmung mit Anstieg des DNA-Gehaltes auf das doppelte der Kontrollgruppe am 5. Inkubationstag. Morphologisch zeigten sich pyknotische Zellkerne und ein längliches ausgezogenes Zytoplasma mit Pseudopodien. 24 Stunden nach Substanzentzug waren die toxischen Zellphänomene voll reversibel. Bei längerer Inkubation verloren die Zellkerne die Teilungsfähigkeit und die Zellschädigung war irreversibel. Der molekulare Mechanismus ist unbekannt und wird möglicherweise auf eine zusätzliche Hemmung der Adenylcyclase zurückgeführt, die in zellfreien Systemen durch Phosphatanaloga gehemmt wird (NEWTON, 1975).

In den tierexperimentellen Studien fand sich eine ausgedehnte erosive Keratitis punctata bei 8maliger täglicher Applikation von 5 % PAA Tropfen an gesunden Kaninchenaugen nach 72 Stunden, die 48 Stunden nach Therapieabbruch nicht mehr nachweisbar waren (GERSTEIN et al., 1975). MEYER et al., 1976 fand keine Nebenwirkung bei einer 6maligen Applikation von 5 % PAA Tropfen über 5 Tage sowie einer 4maligen Applikation von 5 % PAA Salbe über 42 Tage. Die histologische Untersuchung der behandelten Hornhäute zeigten keine Normabweichungen (GORDON et al., 1977). Es sind PAA-resistente Herpesvirusstämme in Gewebekulturen

beschrieben worden (HAY und SUBAK-SHARPE, 1976; BECKER et al., 1977). Studien zur Frage der Regenerationshemmung sind bis jetzt nicht mitgeteilt worden.

3.3. Phosphonoameisensäure (PFA)

3.3.1 Struktur und Pharmakokinetik

Phosphonoameisensäure (PFA) ist eine in der Natur nicht vorkommende anorganische Substanz, die von NYLEN, 1924 synthetisiert wurde. Die Strukturformel der Substanz zeigt Abb. 3. Das Molekulargewicht beträgt 125 Dalton. PFA ist bis zu einer 5 % Lösung (w/w) wasserlöslich. Unterhalb eines pH von 4 dissoziiert die Substanz in PO_4^- und die flüchtige Säure CO_2. Bei systemischer Applikation wird PFA nicht metabolisiert im Urin und Faeces ausgeschieden. 30 % der Substanzdosis wird im Knochen und Knorpel abgelagert (HELGSTRAND et al., 1978 und 1979).

3.3.2 Pharmakodynamik

Unabhängig voneinander berichteten HELGSTRAND et al., 1978 und RENO et al., 1978 über eine 50 % Hemmung der isolierten HSV-1-induzierten DNA-Polymerase durch eine niedrige PFA-Konzentrationen von 3.5 µmol.
Eine ähnlich gute Hemmbarkeit der isolierten RNA-Polymerase des Influenzavirus fanden HELGSTRAND et al., 1978 und CHENG et al., 1981 . PFA hemmte 20fach stärker dies Enzym als PAA. Eine tausendfach stärkere Hemmbarkeit fanden SUNDQUIST und BOEBERG, 1979 für die reverse Transkriptase des Affen und Menschen-pathogenen Retrovirus. MODAK et al., 1980 fand keine Hemmbarkeit der DNA-Polymerase des Retrovirus durch PFA. MARGALITH et al., 1982 konnten mit 10 µmol PFA die DNA-Polymerase und die isolierte reverse Transkriptase von Meloney Mäuseleukämieviren zu 50 % hem-

men. CHANDA und BANERJEE, 1980 fanden bei einer Konzentration von 1 und 5 mmol PFA eine über 90 % Hemmung der Virus-assoziierten RNA-Polymerase des Mundbläschenvirus. Mit 50 bis 55 µmol wurde übereinstimmend eine 50 % Hemmung der isolierten zellulären DNA-Polymerase alpha von HELA-Zellkulturen und Thymusgewebe durch PFA gefunden (HELGSTRAND et al., 1978; SABOURIN et al., 1978; MODAK et al., 1980; ERIKSSON et al., 1982). Die isolierte zelluläre DNA-Polymerase beta wurde nicht durch PFA gehemmt. Die hemmungskinetischen Untersuchungen zeigten eine sofort einsetzende lineare unkompetitive Hemmungskinetik für die DNA-Polymerasen in Abhängigkeit zu den Triphosphatnucleotiden. Analog zum PAA soll der molekulare Angriffspunkt vom PFA die Pyrophosphatbindungsstelle an der DNA-Polymerase sein (MODAK et al., 1980; HELGSTRAND et al., 1978; RENO et al., 1978; SABOURIN et al., 1977).

Eine über 90 % Hemmung in HSV-1 und HSV-2-infizierten Zellkulturen fand sich bei einer Konzentration von 100 bis 150 µmol PFA im Plaquebildungstest. Bei einer PFA-Konzentration von 500 µmol fand sich eine über 99,9 % Hemmung aller Herpesviren. Ab einer Konzentration von 300 µmol war die Hemmbarkeit der Herpesvirus-infizierten Zellkulturen für PFA stärker als für PAA (HELGSTRAND et al., 1979; CHENG, 1981).
Die Hemmung zeigte sich partiell reversibel in Abhängigkeit von dem Inkubationsbeginn und der Inkubationslänge. Der maximal erreichbare Hemmungseffekt für HSV-1 wird bei einem Inkubationsmodus von max. 3 Stunden bis längstens 18 Stunden postinfektiös erreicht. Wurde sofort mit PFA inkubiert, war die Bildung von der HSV-induzierten DNA-Polymerase durch einen noch nicht aufgeklärten Mechanismus unterdrückt. Im Gegensatz zu HSV-1 ist die Virionbildung von HSV-2 nicht komplett durch PFA unterdrückbar (CHENG, 1981).

3.3.3 Experimentelle Studien

ALENIUS et al., 1979 berichten als erste über eine signifikant bessere Abheilung der experimentell erzeugen herpetische Hautinfektion am Meerschweinchen unter 50 bzw. 100 umol PFA bei einer zweimaligen Applikation/Tag.
In einer kontrollierten Folgestudie im Keratitisinfektionsmodell wurde der Therapieerfolg von PFA gegenüber IDU und einer Kontrollgruppe an immunisierten und nicht immunisierten Kaninchen sowie mit unterschiedlichen Konzentrationen und Galenik untersucht. Eine signifikant bessere Abheilung der Keratitis herpetica dendritica fand sich unter 0.1 % IDU im direkten Vergleich zu 3 % PFA (in wässriger Lösung) an nicht immunisierten Kaninchen am 4., 6. und 8. postinfektiösen Tag. Appliziert wurde 12x stündlich in der Tagesphase und 2x stündlich in der Nachtphase vom 2. bis 4. postinfektiösen Tag. 3 % PFA in 0.65 % Methocel^{R}-Lösung zeigte im Vergleich zu der Kontrollgruppe und dem 0.1 % IDU am 4. und 6. Tag einen signifikanten besseren Abheilungsverlauf, während IDU am 8. postinfektiösen Tag signifikanten bessere Ergebnisse zeigte als die 3 % PFA-Gruppe. Appliziert wurde über 4 Tage alle 2 Stunden. Die gleichen signifikant besseren Ergebnisse fanden sich für 0.2 % IDU-Salbe gegenüber der 5 % PFA Salbe. In Analogie zu der rezidivierten HSV-Infektion des Menschen wurden die Kaninchen immunisiert. Auch hier fand sich das gleiche Ergebnis zwischen IDU, PFA und der Kontrollgruppe. 3 % PFA zeigte einen signifikant besseren Abheilungsverlauf der Keratitis herpetica, wenn die Infektion durch PFA-sensible Viren im Vergleich zu PFA-resistenten Viren induziert wurde. Dies ist ein weiterer indirekter Hinweis darauf, daß die hemmende Wirkung von PFA über die virusinduzierte DNA-Polymerase abläuft (ALENIUS et al., 1980). KERN et al., 1978 fand eine signifikante Hemmung im Vergleich zu der Kontrollgruppe bei einer artifiziell erzeugten HSV-2-Infektion des weiblichen Genitaltraktes der Maus und des Meerschweinchen, wenn

innerhalb von 3 bis 24 Stunden nach der Inokulation mit einer Therapie von 10 % PFA intravaginal begonnen wurde.

Über die klinische Anwendung von PFA bei einer Herpesinfektion ist noch nicht berichtet worden.

3.3.4 Toxikologie und Nebenwirkungen

Wird die DNA aus infizierten Zellkulturen isoliert, so findet sich für die Herpes-induzierte DNA-Polymerase bei einer Konzentration von 100 µmol PFA eine 80 % Hemmung, während die isolierten zellulären DNA-Polymerasen nicht gehemmt werden (HELGSTRAND et al., 1979). Eine Konzentration von 500 µmol im Kulturmedium führt zu einer 50 % Hemmung des Zellwachstums von HELA und BU-Kulturen. Dieser Effekt ist nach 24 Stunden noch voll reversibel (CHENG, 1981). STENBERG und LARSSON, 1978 fanden, daß PFA in einer Konzentration von 2 mmol (ca. $2x10^3$fache der therapeutischen Dosis) nach 1 Stunde Inkubation die DNA-Polymerasen von HELA und menschlichen Lungenzellen in ähnlicher Weise zu 50 % hemmte, während die DNA-Synthese und Zellproliferation schon bei einer Konzentration von 1 mmol PFA zu 50 % gehemmt waren. Bei einer Konzentration von 0.1 mmol fand sich keine Proliferationshemmung (STENBERG und LARSSON, 1978).

Keine toxischen Nebenwirkungen sind in ausführlichen toxikologischen Untersuchungen an Ratten bei intravenöser Applikation von PFA und bei einer 5maligen täglichen subkutanen Dosis von 195 mg/kg/KG bzw. von 122 mg/kg/KG an Hunden gesehen worden (FLOTH et al., 1978). Übereinstimmend fanden auch andere Autoren keine toxischen Nebenwirkungen bei systemischer, lokaler und subkutaner Applikation von PFA in therapeutischen Dosen (ALENIUS et al., 1978 und 1980; HELGSTRAND, 1978 und 1979; NEWTON, 1979).

In der Literatur sind keine Studien über die Mutagenität und Carcinogenität mitgeteilt worden. Auch liegen keine Studien über den Einfluß von PFA auf die corneale Regeneration vor.

3.4 Phosphatanaloga 2825 (N5), N 2826 (N6)

Die Gruppe der Phosphatanaloga setzt sich aus den Pyrophosphatanaloga (Diphosphonate) und den Phosphonoacyl-Verbindungen zusammen (ERIKSSON et al., 1982; HAHN, 1972). In Abb. 3 ist die Formel für die Phosphonoacyl-Substanzen mit den substituierbaren Resten R_1 und R_2 wiedergegeben.
An folgenden strukturellen Bedingungen ist die Hemmbarkeit der DNA-Polymerasen von HSV-1, von CMV und von der zellulären DNA-Polymerase alpha gebunden (Übersicht bei ERIKSSON et al., 1982; CHENG et al., 1979).

1. Die nicht veresterte Phosphatgruppe ist essentiell.
2. Die Substitution des R-COOH-Gruppe durch ein $R\text{-}NH_3$ oder durch eine Phenylgruppe führt zum Wirkungsverlust.
3. Die Substitution der R_2-Gruppe führt zu einer Abschwächung der Wirkung.
4. Die Substitution der R_1-Gruppe durch $(CH_2)_n$ mit $n > 3$ führt zum Wirkungsverlust.
5. Zu einer Wirkungsabschwächung führen die alpha-Methylsubstituenten ($R_1=CH_2\text{-}R_3$, $R_3=(CH_2)_n$, n=1-8; R_3= Benzol).

N2825 (N5) und N2826 (N6) sind Phosphoacylverbindungen mit einer selektiven Hemmung der HSV-induzierten DNA-Polymerase (STREISSLE, 1980). GERKE, 1983 fand bei der tierexperimentell induzierten Keratitis dentritica herpetica im Kaninchenmodell einen tendentiell besseren Abheilungsverlauf gegenüber Placebo unter 5 % N6 Tropfen, während die

1 % N6 Tropfen sowie die 1 % und 5 % N5 Tropfen keine Wirkung zeigten.

Bei der experimentellen sekundären tiefen Keratitis herpetica mit Stromabeteiligung fand sich kein Unterschied zum unbeeinflußten Verlauf.
Unter 5 % und 1 % N6 trat eine stärkere Konjunktivitis bis zum Therapieende auf (GERKE, 1983).

II. MATERIAL

1. Tiermaterial

Die Versuche wurden mit nicht trächtigen Kaninchen (Deutscher Riese, Zucht Dahlem) beiderlei Geschlechts mit einem Körpergewicht von 2 bis 3 kg durchgeführt. Den Tieren wurde das Spezialtrockenfutter HERJLAN KAN 271, der Fa. Eggersmann KG, Rinteln und Wasser ad libitum zugeführt. Der Tierstall war durch Tageslicht ausgeleuchtet.

2. Substanzen

Als Lokalanästhetikum benutzten wir eine sterile 2 %ige KOKAINLÖSUNG aus 2 mg Kokainhydrochlorid und 100 ml Aqua bidestillata.

Präoperativ wurden 6 x alle 10 Minuten 2 Tropfen appliziert.

Als kurzwirkendes Oberflächenanästhetikum wurde 0,4 %iges NOVESINER verwendet, wobei 20 ml Lösung 80 mg Oxybuprocainhydrochlorid, 400 mg Borsäure und 1,8 mg Chlorhexidinacetat enthält.

Vor jeder Untersuchung wurde 1 Tropfen appliziert.

NEBACITINR-Augensalbe der Fa. Byk Gulden, Konstanz, mit 3250 I.E. Neomycinsulfat und 250 I.E. Bacitrain in einem Gramm Salbe diente als Grundlage für die 1 %igen und 5 %igen nächtlichen Augensalben.

Die Salbe wurde einmal in der 10stündigen nächtlichen Ruhepause appliziert.

2%iges FLUORESCEIN enthält 0.02264 g Fluorescein-Natrium in 1 ml Aqua bidestillata.

Vor jeder Untersuchung wurden maximal 2 Tropfen appliziert.

Von den Testsubstanzen N5, N6, Phosphonameisensäure (PFA) und Phosphonoessigsäure (PAA) wurde jeweils eine 1 %ige und 5 %ige Lösung mit folgenden Lösungsmitteln und pH-Werten hergestellt:

Substanz	Konzentration	Lösungsmittel	pH-Messung #
TFT	1 %	Hydrosol	5.5
Na (PFA)	1 %	0.9 % NaCl	10.0
Na (PAA)	1 %	0.9 % NaCl	9.9
N 5	1 %	0.9 % NaCl	8.7
N 6	1 %	0.9 % NaCl	8.5
Na (PFA)	5 % *	PBS-Puffer + Aqua dest. (1 : 4)	7.9
Na (PAA)	5 % *	PBS-Puffer + Aqua dest. (1 : 4)	8.0
N5	5 %	PBS-Puffer	8.4
N6	5 %	PBS-Puffer	8.0

* gesättigte Lösungen; PBS = Phosphat buffered saline, pH 7.2
\# Mittelwert aus einer fünfmaligen Messung

Appliziert wurde täglich 14 x 1 Tropfen in einem stündlichen Abstand.

Die Referenzsubstanz, 1 %ige TFT-Tropfen, besteht aus einer sterilen Lösung von 1 g 5-Trifluormethyl-2'-desoxyuridin in Oculo-Hydrosol ad 100 ml, konserviert mit 0,02 %igem Benzalkoniumchlorid. Die 2 %ige TFT-Salbe besteht aus 2g 5-Trifluormethyl-2'-desoxyuridin, 0,5 g Neomycin und 0,1 g Polymyxin-B-sulfat in einer reizlosen Augensalbe ad 100 g, konserviert mit 0,3 %igem Chlorobutanol. Die Substanzen bietet die Firma Dr. Mann, Berlin, im Handel an.

Appliziert wurden 14 x 1 Tropfen im Abstand von einer Stunde. Zur zehnstündigen nächtlichen Ruhepause wurde einmal die Salbe appliziert.

3. Operationsmaterial

Ein 8.0 mm Trepan nach FRANCESCHETTI (Nr. 13270) und ein Skleramesser, Modell Bonn, Schnitt 4 mm, der Firma KLEIN, Heidelberg, wurden bei der Epithelabrasio verwendet.

4. Photomaterial

Zur Photographie wurde die Spiegelreflexkamera OM 1 der Firma OLYMPUS, Tokyo, mit einer Makroobjektivkombination aus 56 mm Zwischenring und 50 mm (1.8) Normalobjektiv genommen. Somit wird ein Motiv im Maßstab 1 : 1 abgebildet. Als Diafilm wurde der KODAK-"Ektrachrom 64" wegen seiner hohen Auflösung im gelb-grünen Farbspektrum gewählt.

III. Methodik

1. Epithelabrasio

Nach lokaler Anästhesie mit 2 %iger Hydrokokainlösung (6 x 2 Tropfen alle 10 Minuten) wird mit dem Trepan zentral ein Kreisschnitt von 8 mm Durchmesser und 0.5 mm Tiefe gesetzt. Unter Anfärbung mit 2 %igem Na-Fluoreszein wird das ausgestanzte Epithel vollständig mit dem Hockeymesser vom Stroma entfernt.

2. Histologie

Nach der Tötung der Tiere wurde das therapierte Auge im zweiten Versuch in toto entfernt und in 10 %iger Formalinlösung nach Lillie fixiert. Die Weiterverarbeitung der Cornea erfolgte nach limbusnaher circulärer Exzision durch H.E., PAS, Toluidin und Masson-Golder gefärbter 8 µm Hartparaffin oder 3 µm Metacrylat eingebetteter Schnitte (HEYDENREICH, 1968).

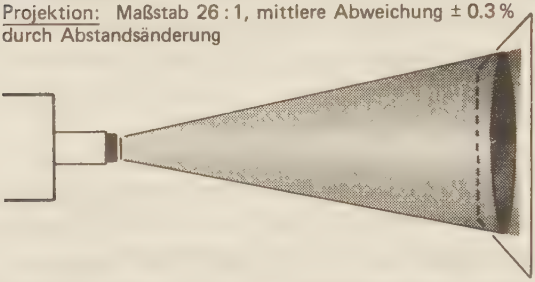
3. Befunddokumentation

3.1. Allgemeines

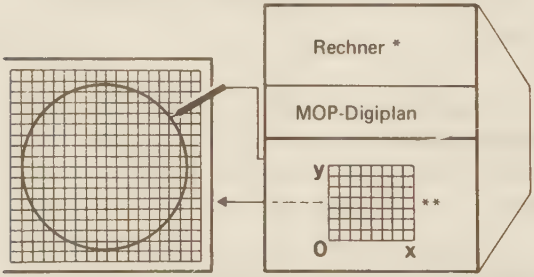
Vor jeder Befunderhebung wird ein Tropfen Novesine zur Anästhesie und ein Tropfen 2 %iges Na-Fluoreszein in den Bindehautsack instilliert. Um die den Befund verfälschende interzelluläre Diffusion des Fluoreszeins zu verhindern, wurde sofort anschließend das Auge mit 0,9 %igem NaCl gespült.

Foto: Annähernder Abbildungsmaßstab 1 : 1, mittlere Abweichung der Defektflächen ± 5 % durch Abstandsänderung bei der Aufnahme

Projektion: Maßstab 26 : 1, mittlere Abweichung ± 0.3 % durch Abstandsänderung



Meßplatz mit Rechner: Meßwert durch Bildung des arithmetischen Mittels aus 3 Meßwiederholungen mit einer maximalen Abweichung von ± 3 % des Flächenwertes



* Epitheldefekt F (mm^2) und % des jeweiligen Ausgangswertes und Berechnung der Regenerationsgeschwindigkeit $V_{(REG)}$ in (mm^2/Std)

** Messung nach dem Magnetostriktionsprinzip: Induktion von Magnetfeldänderungen über den Metallstift mit analoger Übertragung in zwei numerische Koordinaten (x/y)

Abb. 4

3.2 Zeichnungen

Bis zum Therapieabbruch nach 89 Stunden wurde 2 x täglich in 8-stündigem Abstand, danach 1 x täglich, mit Hilfe der Spaltlampe von dem gleichen Beobachter der klinische Befund gezeichnet. Ebenfalls beurteilt wurde die Reaktion der Konjunktiva nach folgendem Schema:

K + , als deutliche Hyperämie aufgrund einer einfachen oder gemischten Injektion
K ++ , als flächenförmige Rötung aufgrund einer Erythrozytendiapedese
K +++ , als interstitielles glasiges Ödem (Chemosis)
E 1 , als leimig-weisses Exsudat
E 2 , als purulentes Exsudat

Ausgewertet wurde die Abheilungszeit (in Stunden und Beobachtungsränge) der Erosion und die konjunktivale Reaktion.

3.3. Photodokumentation

Vor jeder Zeichnung wurde das Auge in seitlicher Beleuchtung standardisiert photographiert und die Defektfläche (F) planimetrisch ausgemessen (Abb. 4). Durch ein spezielles Objektiv (siehe II.4, Seite 54) ergab sich der Abbildungsmaßstab Cornea/Dia von annähernd 1:1. Durch die Abstandsänderung vom Diafilm zur Cornea kam es zu einer Abweichung des Meßwertes von maximal ± 5% laut Vergleich. Zur Ausmessung des Defektes wurde das Dia standardisiert, 26-fach vergrößert, auf Skizzenpapier projiziert und die Randkontur abgezeichnet. Durch eine Abstandsänderung und Verzerrung bei der Projektion ergab sich laut Vergleich eine mittlere Abweichung von ± 0.3 % von der Defektfläche. Der Flächeninhalt (F) der Epithelläsion wurde mit dem

Planimeter, MOP DIGIPLAN der Firma KONTRON, München, durch Bildung des arhimetrischen Mittels über 3 Meßwiederholungen mit einer Standardabweichung von ± 1 % bei großen Flächen und ± 3 % bei kleinen Flächen ermittelt. Punktwolken wurden jeweils nach der Erscheinungsdichte mit einem Faktor mit 0.75, 0.5 oder 0.25 korregiert. Angegeben wird der Epitheldefekt (F) in (mm^2) und in % des jeweiligen Ausgangswertes vor Therapiebeginn. Die Regenerationsgeschwindigkeit V(reg) = (F1-F2)/Std wird in mm^2/Std. angegeben. In den Ergebnistabellen sind die Rohwerte der Flächen-Planimetrie in cm^2 angegeben. Der Umrechnungsfaktor von cm^2 in mm^2 beträgt 690. (Beispiel: Der 8 mm durchmessende Trepan hat eine Fläche von 50.3 mm^2. Wird die Fläche 26.25-fach vergrößert, ergibt sich eine Fläche mit einem Flächeninhalt von 346 cm^2 und einem Durchmesser von 21 cm. Der Umrechnungsfaktor errechnet sich somit auf 690).

4. Versuchsplanung

20 Kaninchen wurden auf äußere Augenerkrankungen untersucht und durchnummeriert. Nach dem Zufallsprinzip wurden 5 Gruppen zu je 4 Tieren zusammengestellt und mit neuer Versuchsbezeichnung einer Testsubstanz zugeordnet.

In dem Versuch 1 wurde das Regenerationsverhalten der Cornea des linken Auges unter der Therapie mit den 1 %igen Lösungen von N5, N6, PFA, PAA und der 2 %igen Salbe von TFT untersucht. Im vierwöchigen Abstand wurde unter der Therapie mit den 5 %igen Substanzlösungen N5, N6, PFA, PAA und den 1 %igen TFT-Tropfen an dem jeweils entsprechenden rechten Auge das Regeneratonsverhalten der Cornea im Versuch 2 untersucht. In beiden Versuchen wurde die doppelte klinische Tagesdosis von 14 Tropfen (CARMINE et al., 1982; PAVAN-LANGSTON und FOSTER, 1977) der TFT-Therapie als Referenzsubstanz appliziert.

Der Tag/Nachtrhythmus blieb mit einer 10-stündigen Therapiepause nachts erhalten, währenddessen ein Antibiotikaschutz mit einer einmaligen Applikation von der jeweiligen Substanz in Nebacetinsalbe bestand. Mit der Therapie wurde 2 Stunden nach der Epithelabrasio begonnen. Wenn mehr als 10 Augen pro Versuch abgeheilt waren, wurde die Therapie abgebrochen. Die Befunderhebung wurde zweimal täglich bis zum Therapieabbruch durchgeführt, danach nur einmal pro Tag mit weiterlaufendem Antibiotikaschutz bis zum endgültigen Versuchsabbruch.

5. Statistik

Zur Beurteilung des Unterschiedes zwischen jeweils 2 Substanzgruppen wurde der Wilcoxon-Mann-Whitney-Test (Wissenschaftliche Tabellen, GEIGY, 1960) verwendet. Unterschiede zwischen ihnen wurden als signifikant angesehen, wenn die Sicherheit der zweiseitigen Irrtumswahrscheinlichkeit unter 0.05 lag. Bei Werten der Irrtumswahrscheinlichkeit zwischen 0.05 und 0.1 wurden die Unterschiede unter Berücksichtigung der kleinen Stichprobengröße als verdächtig eingestuft.

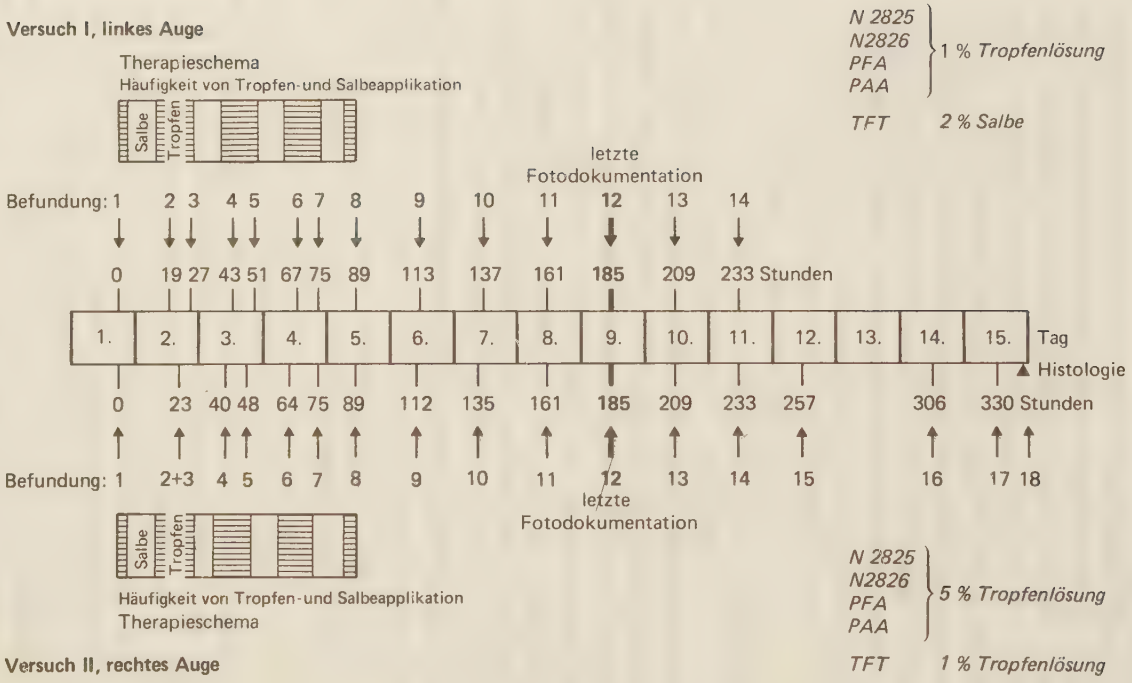

Versuch I, linkes Auge
Therapieschema
Häufigkeit von Tropfen-und Salbeapplikation
Salbe
Tropfen
N 2825
N2826
PFA
PAA
1 % Tropfenlösung
TFT
2 % Salbe
letzte
Fotodokumentation
Befundung: 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14
0 19 27 43 51 67 75 89 113 137 161 185 209 233 Stunden
1. 2. 3. 4. 5. 6. 7. 8. 9. 10. 11. 12. 13. 14. 15. Tag
Histologie
0 23 40 48 64 75 89 112 135 161 185 209 233 257 306 330 Stunden
Befundung: 1 2+3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18
letzte
Fotodokumentation
Salbe
Tropfen
Häufigkeit von Tropfen-und Salbeapplikation
Therapieschema
N 2825
N2826
PFA
PAA
5 % Tropfenlösung
TFT
1 % Tropfenlösung
Versuch II, rechtes Auge

Abb.: 5

IV. Versuche

1. Versuch I

1.1. Durchführung

Die Therapie wurde am Abend des 1. Versuchstages 2 Stunden nach der operativen Epithelabrasio des linken Auges begonnen und am 5. Versuchstag nach 89 Stunden mit insgesamt 53 Applikationen abgebrochen. Bis zum 9. Versuchstag (185) Stunden) wurde der Augenstatus photographiert, die Zeichnungen bis zum 11. Versuchstag (233 Stunden) weiterhin fortgesetzt. Beobachtungs- und Therapieschema sind in der Abb. 5 dargestellt. Den gezeichneten klinischen Augenbefund zeigt die Abb. 18, Seite 86. Die Auswertung der Photos geben die jeweiligen Tabellen und Abbildungen zu den einzelnen Substanzen wieder.

1.2. Ergebnisse

1.2.1. N5 1 % Tropfen

a.) Klinischer Befund

Das Epithel war bei Tier 2, 3 und 4 am 3. Versuchstag nach 51 Stunden (5. Befund) geschlossen. Nach 67 Stunden (6. Befund) fand sich bei Tier 1 nur noch eine Trübung, die im weiteren Verlauf als Macula bestehen blieb.
Es kam bei allen Tieren nach 19 Stunden (2. Befund) zu konjunktivalen Nebenwirkungen, die erst nach 43 Stunden (4. Befund) nicht mehr vorhanden waren.

b.) Abheilungsverlauf

Abb. 6 und 7 sowie Tabelle 2 und 3 zeigen den Verlauf.

Der Ausgangsdefekt lag zwischen 80 % und 93 % der möglichen Trepanfläche. Die corneale Erosion heilte bei Tier 2, 3 und 4 in einem homogenen exponentialfunktionsähnlichen Kurvenbild ab. Die Regenerationsgeschwindigkeiten folgten annähernd einer Geraden. Auffallend ist, daß die Erosion bei Tier 1 innerhalb der Dauerapplikationsphase t(2) und t(4) schneller heilte, als in den entsprechenden Phasen t(1) und t(3) mit der nächtlichen Applikationspause. Dies kann ein diskreter Hinweis auf eine Proliferationsinduktion des Epithels durch N5 sein.

Abb.: 6 Hemmung der Epithelregeneration I unter Therapie mit :

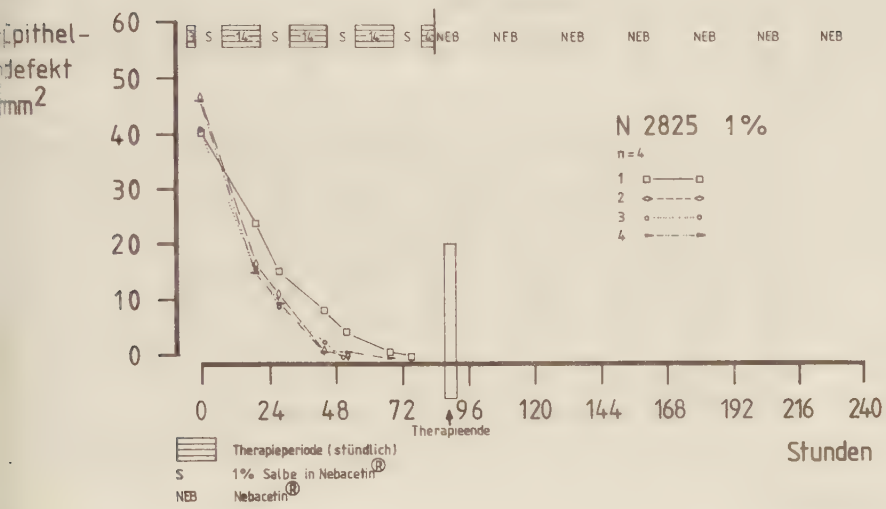
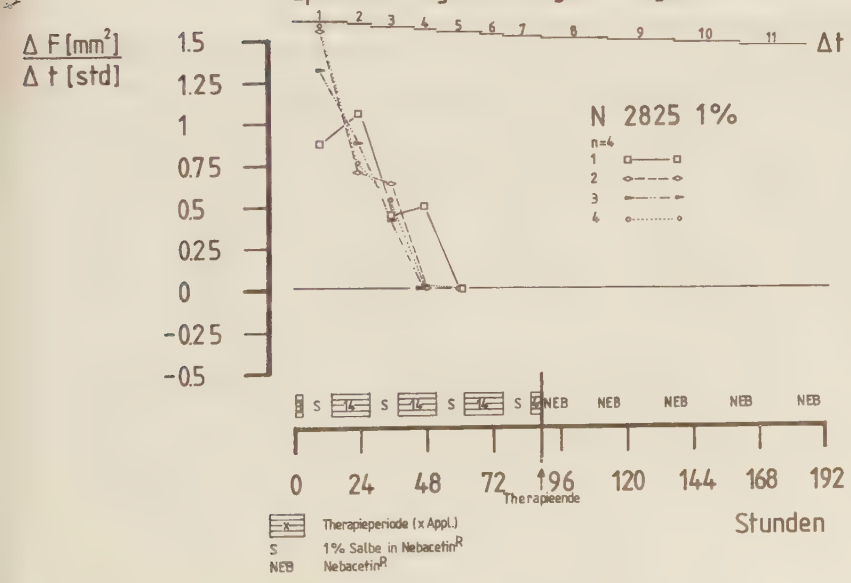


Abb.: 7 Epitheliale Regenerationsgeschwindigkeit unter :



Epitheldefekt (cm2) unter der Therapie mit:

N5 1 %ige Tropfen

Zeit (Std.)	Tier 1 abs.	(%)	Tier 2 abs.	(%)	Tier 3 abs.	(%)	Tier 4 abs.	(%)
0	276	(100)	322	(100)	281	(100)	317	(100)
19	162	(59)	115	(36)	107	(38)	104	(33)
27	103	(37)	75	(23)	60	(21)	61	(19)
43	56	(20)	6	(1.9)	14	(5)	2	(0.6)
51	26	(9)	0		0		0.6	(0.2)
67	0.4	(0.2)	-		-		0	
75	0		-		-		-	
89*	-		-		-		-	

* Therapieende

Tab. 2

Regenerationsgeschwindigkeit (mm2/Std.) unter Therapie mit:

N5 1 %ige Tropfen

t (Std.)	Tier 1	Tier 2	Tier 3	Tier 4
t(1) 19	0.87	1.56	1.32	1.63
t(2) 8	1.05	0.70	0.88	0.75
t(3) 16	0.44	0.64	0.41	0.55
t(4) 8	0.50	abgh.	abgh.	0.02
t(5) 16	0.23	-	-	abgh.
t(6) 8	abgh.	-	-	-

Tab. 3

1.2.2. N6 1 % Tropfen

a.) Klinischer Befund

Am 3. Versuchstag war der Defekt bei Tier beta nach 51 Stunden (5. Befund) geschlossen, obwohl eine nabeculöse Trübung in zwei weiteren Beobachtungen auf eine stromale Beteiligung hinwies. Danach folgte am 4. Versuchstag nach 67 Stunden (6. Befund) Tier gamma und delta komplikationslos. Vor dem Therapieabbruch am 5. Versuchstag nach 89 Stunden (8. Befund) konnte bei Tier alpha keine Erosion mehr beobachtet werden.
Nach 19 Stunden zeigte sich eine konjunktivale Nebenwirkung bei zwei Tieren. Der weitere Verlauf blieb aber ohne Begleitreaktionen.

b.) Abheilungsverlauf

Abb. 8 und Abb. 9 sowie Tabelle 4 und 5 zeigen den Verlauf.

Der jeweilige Ausgangsdefekt der Gruppe lag im Mittel bei 89 % der Trepanfläche. Drei Tiere zeigten eine homogene Abheilungskurve, während bei Tier alpha die Erosion vom 3. zum 4. Befund nur um 1 % bezogen auf die Ausgangsfläche abnahm und sich somit die Abheilzeit verlängerte. Auffallend ist, daß bei Tier alpha, beta und gamma die anfängliche V(reg) in der t(1)-Phase mit 0.68 bis 1.05 mm2/Std. relativ niedrig war, während in der Dauerapplikationsphase t(2) die entsprechenden V(reg) der drei Tiere deutlich höher lagen. Bei Tier alpha wiederholte sich der oben beschriebene Verlauf in der t(3) und t(4)-Phase.
Somit scheint es unter den 1 %igen 6-Tropfen zu einer direkten dosisabhängigen Zunahme der Epithelregeneration zu kommen.

Abb.: 8

Hemmung der Epithelregeneration I unter Therapie mit :

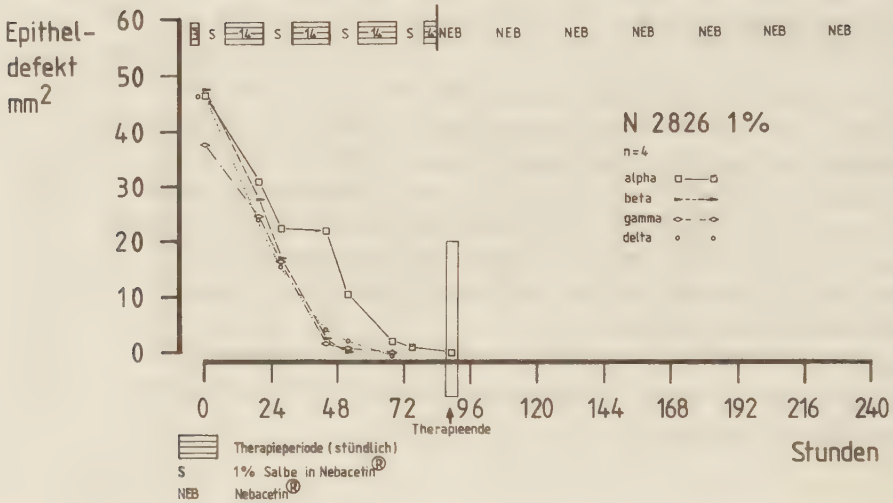
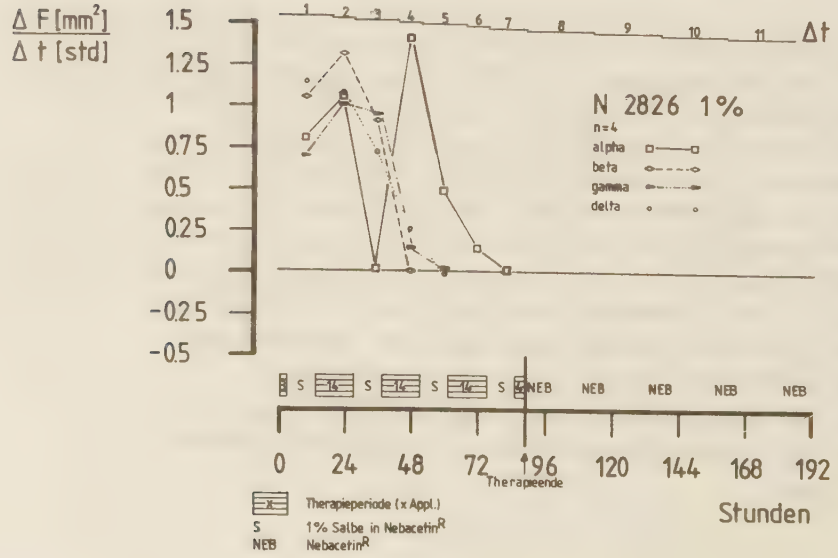


Abb.: 9

Epitheliale Regenerationsgeschwindigkeit unter :



Epitheldefekt (cm2) unter der Therapie mit:

N6 1 %ige Tropfen

Zeit (Std.)	Tier alpha abs.	(%)	Tier beta abs.	(%)	Tier gamma abs.	(%)	Tier delta abs.	(%)
0	323	(100)	328	(100)	259	(100)	323	(100)
19	216	(67)	190	(58)	169	(65)	166	(51)
27	155	(48)	117	(36)	115	(44)	108	(33)
43	151	(47)	19	(5.8)	11	(4.2)	27	(8.4)
51	73	(23)	0		3.7	(1.4)	13	(4)
67	13	(4)	-		0		0	
75	7.4	(2.3)	-		-		-	
89*	0		-		-		-	
113	-		-		-		-	

* Therapieende

Tab. 4

Regenerationsgeschwindigkeit (mm2)/Std.) unter Therapie mit:

N6 1 %ige Tropfen

t (Std.)	Tier alpha	Tier beta	Tier gamma	Tier delta
t(1) 19	0.82	1.05	0.68	1.18
t(2) 8	1.06	1.31	1	1.06
t(3) 16	0.03	0.87	0.44	0.73
t(4) 8	1.44	abgh.	0.13	0.25
t(5) 16	0.5	-	abgh.	abgh.
t(6) 8	0.13	-	-	-
t(7) 14	abgh.	-	-	-

Tab. 5

1.2.3. PFA 1 % Tropfen

a.) Klinischer Befund

Vor dem Therapieabbruch war ein Epitheldefekt bei Tier c am 4. Versuchstag nach 75 Stunden (7. Befund) und bei Tier b und d am 5. Versuchstag nach 89 Stunden (8. Befund) nicht mehr zu beobachten. Am 6. Versuchstag nach 113 Stunden (9. Befund) war die Epitheldecke bei Tier a geschlossen. Da sich weiterhin eine maculöse und nabeculöse Trübung nachweisen ließ, kann die längere Abheilzeit von Tier a auf eine Verzögerung durch eine stromale Mitbeteiligung an der Regeneration zurückgeführt werden.
Es traten keine konjunktivalen Nebenwirkungen auf.

b.) Abheilungsverlauf

Abb. 10 und 11 sowie Tab. 6 und 7 zeigen den Verlauf.

Der anfängliche Epitheldefekt lag im Mittel bei 91 % der Trepanfläche. Die Abnahme der Erosion zeigt bei den einzelnen Tieren einen weniger homogenen, individuellen Verlauf. Ebenfalls zeigen die als Gerade zu idealisierenden Regenerationsgeschwindigkeiten eine weniger steile Abnahme. Auffallend ist, daß der Defekt bei Tier b in der Dauerapplikationsphase t(2) nur um 3 % der Ausgangsfläche mit 0.19 mm2/Std. abnahm. In der Nachtphase t(3) entsprach die V(reg) mit 0.75 mm2/Std. denen der anderen Tiere. In der nächsten Dauerapplikationsphase t(4) war die V(reg) erneut vergleichbar niedrig.
Es scheint unter einer Therapie mit 1 % PFA-Tropfen zu einer individuellen unterschiedlichen, eventuell dosisabhängigen Hemmung der Epithelisierung zu kommen.

Abb.: 10

Hemmung der Epithelregeneration I unter Therapie mit :

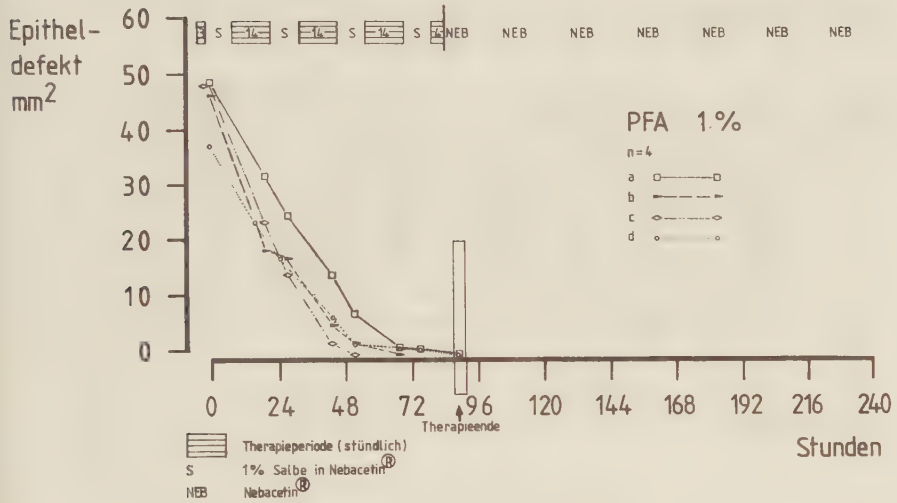
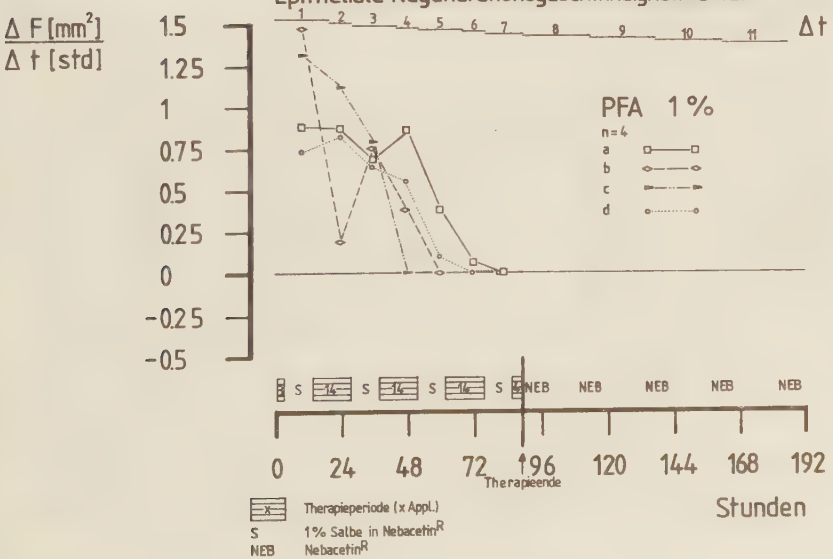


Abb.: 11

Epitheliale Regenerationsgeschwindigkeit unter :



Epitheldefekt (cm2) unter der Therapie mit:

PFA 1 %igen Tropfen

Zeit (Std.)	Tier a abs.	(%)	Tier b abs.	(%)	Tier c abs.	(%)	Tier d abs.	(%)
0	340	(100)	323	(100)	335	(100)	258	(100)
19	222	(65)	129	(40)	163	(49)	163	(63)
27	173	(51)	118	(37)	99	(30)	116	(45)
43	98	(29)	35	(11)	13	(3.9)	41	(16)
51	49	(14)	13	(4)	0		11	(4.3)
67	4.5	(1.3)	0		-		1.3	(0.5)
75	0.8	(0.2)	-		-		1.3	(0.5)
89*	0		-		-		0	
113	-		-		-		-	

* Therapieende

Tab. 6

Regenerationsgeschwindigkeit (mm2/Std.) unter Therapie mit:

PFA 1 %ige-Tropfen

t (Std.)	Tier a	Tier b	Tier c	Tier d
t(1) 19	0.9	1.48	1.32	0.74
t(2) 8	0.88	0.19	1.13	0.81
t(3) 16	0.69	0.75	0.79	0.69
t(4) 8	0.88	0.4	abgh.	0.55
t(5) 16	0.4	abgh.	-	0.09
t(6) 8	0.07	-	-	0
t(7) 14	abgh.	-	-	abgh.

Tab. 7

1.2.4. PAA 1 % Tropfen

a.) Klinischer Verlauf

Am 5. Versuchstag nach 89 Stunden (8. Befund) war eine Erosion bei Tier D nicht mehr zu beobachten. Nach dem Therapieende folgte die Abheilung am 6. Versuchstag nach 113 Stunden (9. Befund) bei Tier B und C und am 7. Versuchstag nach 137 Stunden (10. Befund) bei Tier A. Auffallend ist, daß nach der Epithelialisierung der artefiziellen Erosion disseminierte, stecknadelkopfgroße Epithelläsionen zu beobachten waren. Dies scheint ein toxischer Einfluß auf den Stoffwechsel der Epithelzellen während der Medikation zu sein.
Es traten keine konjunktivalen Nebenwirkungen auf.

b.) Abheilungsverlauf

Abb. 12 und Abb. 13 sowie Tab. 8 und 9 zeigen den Verlauf.

Der anfängliche Epitheldefekt war im Mittel mit 79 % der möglichen Trepanfläche vergleichsmäßig klein. Tier D zeigte einen relativ unauffälligen Regenerationsverlauf, obwohl die anfängliche V(reg) mit 0.74 mm2/Std. niedrig war. Auffallend ist der Verlauf von Tier B und C. Während der 8-stündigen Dauerapplikationsphase t(2) lag bei Tier A die V(reg) mit 0.5 mm2/Std. relativ niedrig, bei Tier B mit 0.13 mm2/Std. sehr niedrig, während sich bei Tier C die Erosion von 40 % auf 46 % bezogen auf die Ausgangsfläche vergrößerte. In der t(3)-Phase mit der nächtlichen Applikationspause nahmen die V(reg) von Tier B und C wieder über Werte von 1 mm2/Std. zu, während die V (reg) von Tier A auch noch in der nächsten Phase annähernd den gleichen

Wert behielt. In der Dauerapplikationsphase t(4) verrringerte sich wieder deutlich die Abnahme der Defektfläche bei Tier B, während sich bei Tier A die Erosion in der Dauerapplikationsphase t(6) nochmals geringfügig vergrößerte.

Der Verlauf der Regeneration bei Tier A, B und C zeigte eine deutliche negative Beeinflussung der cornealen Epithelregeneration während der Therapie mit 1 % PAA-Tropfen, der offensichtlich individuell dosisabhängig ist.

Abb.: 12

Hemmung der Epithelregeneration I unter Therapie mit :

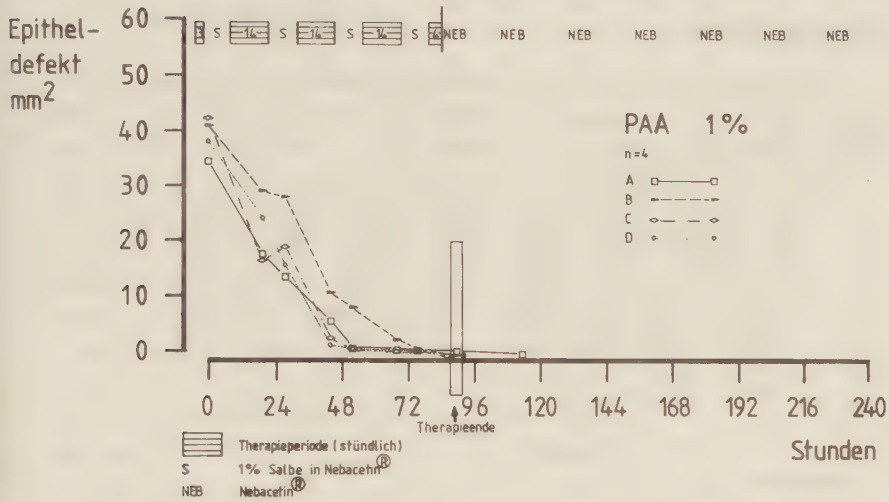
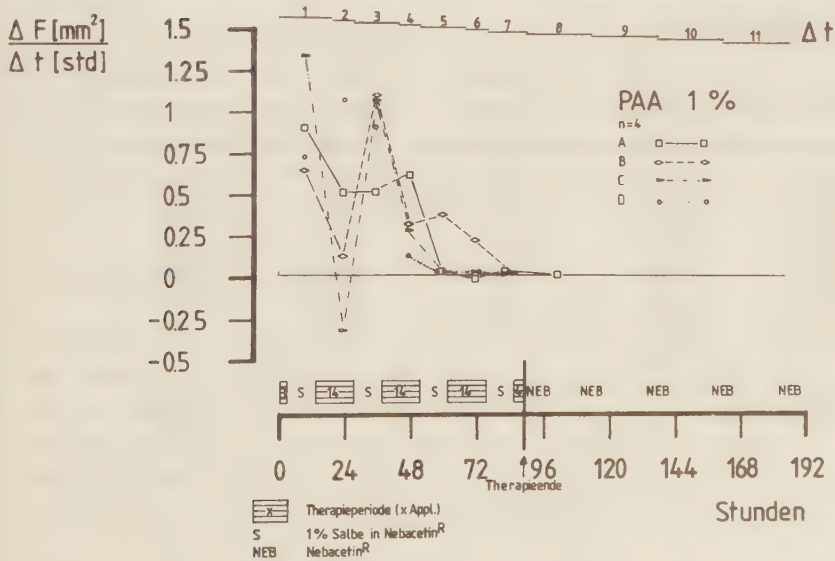


Abb.: 13

Epitheliale Regenerationsgeschwindigkeit unter :



Epitheldefekt (cm2) unter der Therapie mit:

PAA 1 %ige Tropfen

Zeit (Std.)	Tier A abs.	(%)	Tier B abs.	(%)	Tier C abs.	(%)	Tier D abs.	(%)
0	244	(100)	288	(100)	294	(100)	268	(100)
19	125	(51)	204	(71)	118	(40)	169	(63)
27	97	(40)	198	(69)	135	(46)	111	(41)
43	41	(17)	77	(27)	20	(6.8)	11	(4.1)
51	6.6	(2.7)	60	(21)	4.7	(1.6)	3.6	(1.3)
67	3.6	(1.5)	18	(6.3)	3.2	(1.1)	2.1	(0.8)
75	4.4	(1.8)	5.7	(2)	1.4	(0.5)	1.1	(0.4)
89*	2.8	(1.2)	0		0		0	
113	0		-		-		-	
137	-		-		-		-	

* Therapieende

Tab. 8

Regenerationsgeschwindigkeit (mm2/Std.) unter Therapie mit:

PAA 1 %igen Tropfen

t (Std.)	Tier A	Tier B	Tier C	Tier D
t(1) 19	0.9	0.63	1.34	0.74
t(2) 8	0.5	0.13	0.32	1.03
t(3) 16	0.5	1.1	1.07	0.91
t(4) 8	0.6	0.32	0.27	0.13
t(5) 16	0.03	0.38	0.02	0.02
t(6) 8	0.02	0.22	0.03	0.02
t(7) 14	0.02	abgh.	abgh.	abgh.
t(8) 24#	abgh.	-	-	-

\# therapiefrei

Tab. 9

1.2.5 TFT 2 %ige Salbe

a.) Klinischer Verlauf

Zum Zeitpunkt des Therapieendes war kein Defekt abgeheilt. Am 11. Versuchstag nach 233 Stunden (14. Befund) war die Epitheldecke bei Tier II, III und IV geschlossen, während bei Tier I noch weiterhin disseminierte punktähnliche Erosionen vorhanden waren. Nachdem die Epitheldecke bei Tier IV am 8. Versuchstag nach 161 Stunden (11. Befund) geschlossen war und sich nur noch eine nabeculöse Trübung fand, kam es nach 24 Stunden zu einem großflächigen Epithelaufbruch. Auffallend war die allgemeine langsame Abheiltendenz nach dem Therapieende, wobei es immer wieder zu neuen punktwolkenartigen Erosionen kam.
Es kam am 4. Versuchstag nach 67 Stunden (6. Befund) bei allen Tieren zu einer konjunktivalen Injektion. Am 5. und 6. Versuchstag fand sich bei drei Tieren eine exsudative Konjunktivitis, die erst 48 Std. nach dem Therapieende, bzw. bei Tier III nach 72 Stunden, nicht mehr zu beobachten war.
Die Therapie mit der 2 % TFT-Salbe führte somit einerseits zu einer erheblichen Verlängerung der Abheilzeiten, andererseits war ein toxischer, vermutlich dosisabhängiger Einfluß auf die Epithelialisierung der cornealen Wunde nachweisbar, wobei es komplikativ zu einer erheblichen, teilweise exsudativen Konjunktivitis kam.

b.) Abheilungsverlauf

Abb. 14 und Abb. 15 sowie Tab. 10 und Tab. 11 zeigen den Verlauf.
Der anfängliche Epitheldefekt lag im Mittel bei 82 % der Trepanfläche. Zum Zeitpunkt des Therapieendes am 5. Versuchstag hatte Tier I noch eine Defektfläche von 6,4 %, Tier II von 1,8 %, Tier III von 22 % und Tier IV von 15 %

der jeweiligen Ausgangsfläche. Einen vergleichbaren Regenerationsverlauf zeigten Tier III und IV. Die anfängliche V(reg) in der t(1)-Phase ist mit 0.61 mm2/Std. relativ niedrig. In der 8-stündigen Dauerapplikationsphase t(2) nimmt der Epitheldefekt bei Tier III von 73 % auf 75 % und bei Tier IV von 70 % auf 75 % der jeweiligen Ausgangsfläche zu. Überraschend hoch war die V(reg) in der t(3)-Phase bei Tier III mit 1.13 mm2/Std., in der der Defekt auf 27 % der Ausgangsfläche abnahm, im Gegensatz zu Tier IV, bei dem in dieser Phase der nächtlichen Applikationspause die V(reg) bei 0.5 mm2/Std. lag.

Bei Tier I fällt bis dahin nur die Heilungsverzögerung in der t(2)-Phase auf, während sich der Heilungsverlauf von Tier II in entgegengesetzter Weise verhält. Auf die anfängliche, sehr niedrige von allen Tieren am kleinste V(reg) in der t(1)-Phase von 0.48 mm2/Std., folgte in der t(2)-Phase eine erhebliche Abnahme der Fläche von 77 % auf 50 % bezogen auf die Ausgangsfläche und in der folgenden nächtlichen Applikationspause mit einer vergleichsweise niedrigen V(reg) von 0.6 mm2/Std. eine geringe Abnahme der Defektfläche. Allerdings war in der nächsten Dauerapplikationsphase t(4) die V(reg) wie bei den anderen Tieren deutlich niedriger.

Trotz nächtlicher Applikationspause in der t(5)-Phase verkleinerte sich nur noch der Defekt bei Tier II von 17 % auf 4.3 % der Ausgangsfläche, während bei Tier IV die Regeneration stagnierte und sich der Defekt bei Tier I und III vergrößerte. In der t(6)-Dauerapplikationsphase stagnierte der Heilungsprozeß bei Tier I und II. Bei Tier III und IV nahm der Defekt gering ab.

Am 4. Versuchstag nach 75 Stunden (7. Befund) schritt der Heilungsprozeß bei allen 4 Tieren nicht mehr fort und selbst in der folgenden therapiefreien Zeit nahmen die Defektflächen nur langsam ab. Am 9. Versuchstag nach 185 Stunden (12. Befund) hatten Tier I noch einen Defekt von 1,5 %, Tier II von 3,7 %, Tier III von 10 % und Tier IV von 9 % bezogen auf den anfänglichen Epitheldefekt.

Abb.: 14 Hemmung der Epithelregeneration I unter Therapie mit :

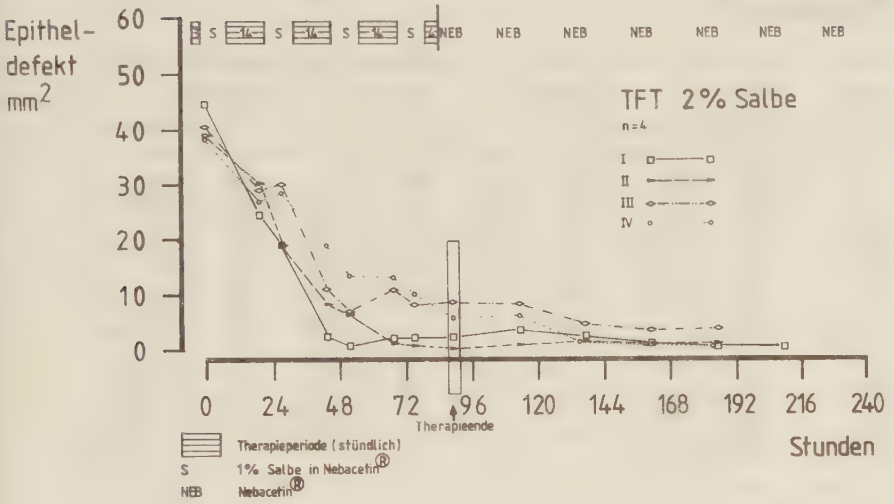
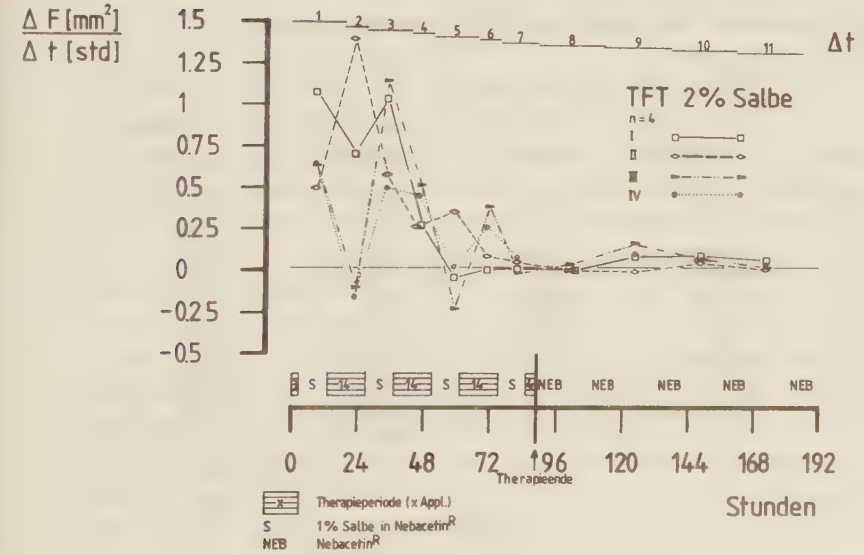


Abb.: 15 Epitheliale Regenerationsgeschwindigkeit unter :



Epitheldefekt (cm2) unter der Therapie mit:

TFT 2 %ige Salbe

Zeit (Std.)	Tier I abs.	(%)	Tier II abs.	(%)	Tier III abs.	(%)	Tier IV abs.	(%)
0	312	(100)	274	(100)	283	(100)	269	(100)
19	174	(56)	210	(77)	205	(73)	189	(70)
27	134	(43)	137	(50)	212	(75)	202	(75)
43	22	(7.1)	61	(22)	80	(28)	136	(51)
51	8.3	(2.7)	47	(17)	51	(18)	98	(37)
67	18	(5.9)	12	(4.3)	80	(28)	94	(35)
75	19	(6)	8.2	(3)	58	(20)	71	(27)
89*	20	(6.4)	4.8	(1.8)	62	(22)	40	(15)
113	27	(8.8)	9.3	(3.4	58	(20)	45	(17)
137	17	(5.4)	14	(5)	35	(12)	12	(4.5)
161	9.2	(3)	9	(3.3)	27	(9.6)	10	(3.8)
185	4.8	(1.5)	10	(3.7)	29	(10)	9	(3.3)
209	4.4	(1.4)	-		-		-	

* Therapieende

Tab. 10

Regenerationsgeschwindigkeit (mm2/Std.) unter Therapie mit:

TFT 2 %ige Salbe

t (Std.)	Tier I	Tier II	Tier III	Tier IV
t(1) 19	1.06	0.48	0.61	0.61
t(2) 8	0.69	1.38	0.13	0.19
t(3) 16	1.02	0.66	1.13	0.5
t(4) 8	0.25	0.25	0.5	0.44
t(5) 16	0.09	0.33	0.25	0
t(6) 8	0.01	0.07	0.38	0.25
t(7) 14	0.02	0.04	0.04	0.07
t(8) 24#	0.04	0.03	0.02	0.02
t(9) 24#	0.07	0.03	0.15	0.09
t(10) 24#	0.05	0.03	0.05	0.04
T(11) 24#	0.03	0.01	0	0.01

\# therapiefrei

Tab. 11

1.3. Vergleich der Substanzgruppen im Versuch I

1.3.1. Abheilzeiten

Substanz	Wiederholungen				mittl. Abheilungszeit (Std.) M ± SE
N5 1% Tr.	5	5	5	6	55 +/- 8
N6 1% "	5	6	6	8	68 +/-15
PFA 1% "	7	8	8	9	92 +/-16
PAA 1% "	8	9	9	10	113 +/-20
TFT 2% Salbe	14	14	14	18	über 233

Tab. 12

Die Abheilzeiten wurden nach dem klinischen Befund aus der Abb. 18 Seite 86 ausgewertet. In Tab. 12 wurden die Abheilzeiten der einzelnen Tiere als Beobachtungsränge wiedergegeben.

Die Therapie mit den 1 % Substanzen PFA, PAA und 2 % TFT-Salbe führte zu einer statistisch signifikanten ($2p \leq 0.05$) längeren Abheilzeit, als die Therapie mit 1 % N5. Zwischen den Therapien mit den 1 % Substanzen N6, PFA und PAA läßt sich anhand der vorliegenden Stichprobe kein signifikanter Unterschied in den Abheilzeiten statistisch sichern, obwohl die Therapie mit PFA und PAA offensichtlich im Mittel zu längeren Abheilzeiten führte. Zu deutlich längeren Abheilzeiten gegenüber den anderen Substanzen führte die Therapie mit 2%iger TFT-Salbe und muß daher als gesichert ($2p \leq 0.05$) toxisch auf den Abheilungsverlauf einer epithelialen cornealen Wunde gelten.
Tab. 13 faßt das Ergebnis schematisch zusammen.

Tab. 13: Tabellarische Zusammenstellung des Vergleiches der Abheilzeiten

	N5 1 % Tr.			
1 % Tr. N 6	0	N6 1 % Tr.		
1 % Tr. PFA	**	+	PFA 1 % Tr.	
1 % Tr. PAA	**	+	+	PAA 1 % Tr.
2 % Sa. TFT	**	**	**	**

WILCOXON-Test
für zwei Stichproben
* $2p \leq 0.10$
** $2p \leq 0.05$

\+ Tendenz längerer Abheilzeiten von links nach rechts

1.3.2. Abheilungsverlauf

Abb. 16 und Abb. 17 sowie Tab. 14 und Tab. 15 zeigen den Verlauf der Regeneration anhand der Mittelwerte für die einzelnen Substanzen. Für die statistische Aussage wurden die jeweiligen einzelnen Werte mit dem WILCOXON-Test für 2 Stichproben verglichen. In Tab. 34, Seite 126 ist das Ergebnis tabellarisch zusammengefaßt.

Die Mittelwerte der epithelialen Defekte der N5-Gruppe folgten einer homogen abnehmenden Exponentialfunktion und die Regenerationsgeschwindigkeit läßt sich durch eine Gerade idealisieren. In den ersten 75 Stunden zeigt der Abheilungsverlauf von der PAA und der TFT-Gruppe einen auffallend parallelen Verlauf. Die PFA und N6-Gruppe unterschieden sich im gesamten Verlauf nur in der V(reg) unerheblich. Allerdings lagen die epithelialen Defekte der PAA-Gruppe im Bereich des PFA und N6 Verlaufes. Am 2. Versuchstag nach 27 Stunden (3. Befund) und am 4. Versuchstag nach 67 Stunden (6. Befund) waren die prozentualen Defektflächen der N5-Gruppe signifikant ($2p \leq 0.10$) niedriger als die der PAA und der TFT 2 % Salbengruppe. Nach 75 Stunden (7. Befund) hatte die N5 Gruppe signifikant ($2p \leq 0.10$) niedrigere Flächendefekte als die N6, PFA und PAA-Gruppe, während die epithelialen Defekte der TFT-Salbengruppe signifikant ($2p \leq 0.05$) größer als bei den anderen Substanzengruppen waren. Im weiteren Verlauf blieben die Defekte der TFT-Salbengruppe signifikant ($2p \leq 0.05$) größer. In der t(1)-Phase war nur die mittlere V(reg) der TFT-Salbengruppe und in der t(2)-Dauerapplikationsphase auch die der PAA-Gruppe im Vergleich deutlich niedriger. Allerdings läßt sich anhand der vorliegenden Stichprobe ein Unterschied statistisch nicht sichern. Andererseits lag die V(reg) der N6-Gruppe in dieser Phase signifikant höher als bei der N5 und der PAA-Gruppe. Eine weitere vergleichende Interpretation der V(reg) ist aufgrund der verschiedenen Flächengrößen nicht mehr sinnvoll. Deutlich gering waren die mittleren V(reg) vor dem Therapieende in der t(5),(6),(7)-Phase bei der PAA und TFT-Gruppe. Ebenfalls nahm der Epitheldefekt bei der TFT-Salbengruppe im Mittel nach dem Therapieende nur sehr langsam ab.

Somit läßt sich nach 75 Stunden (7. Befund) eine anhaltende Hemmung der Epithelregeneration durch 2 %ige TFT-Salbe gegenüber den anderen Substanzen nachweisen, während die

Epithelregeneration durch 1 %ige PAA Tropfen zu diesem Zeitpunkt nur gesichert gegenüber N5 und PFA verlangsamt ist. Beide Substanzen haben eine vermutlich dosisabhängige toxische Nebenwirkung auf die Epithelregeneration, die bei der 2 %igen TFT-Salbe stärker kumulativ zu sein scheint.

Abb.: 16

Hemmung der Epithelregeneration I unter Therapie mit :

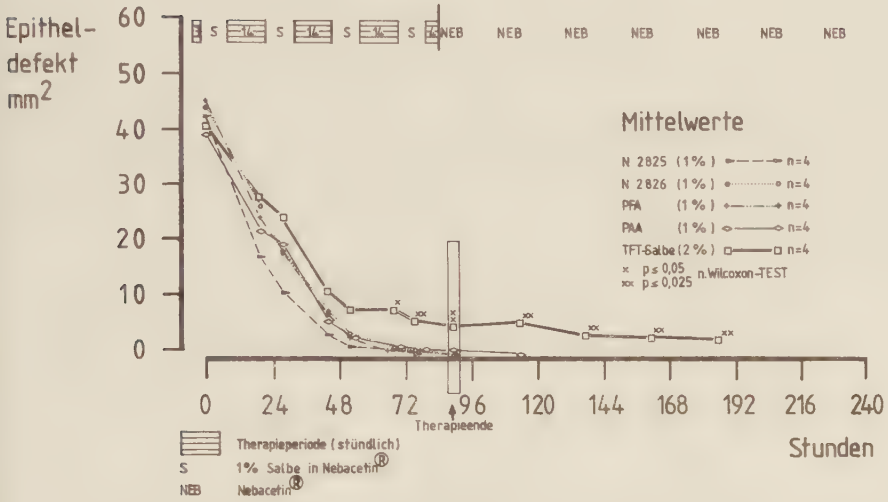
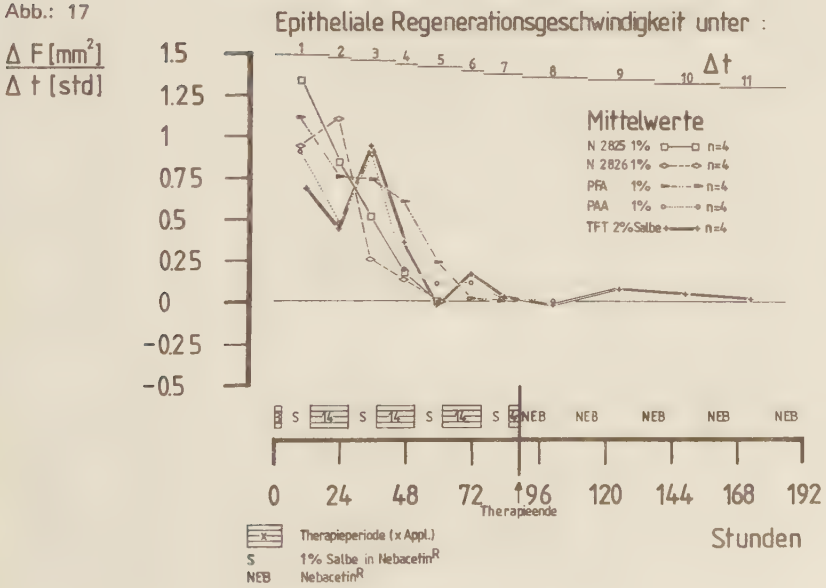


Abb.: 17



Epitheldefekt (cm2) unter der Therapie mit:

Mittelwerte Versuch I

Zeit (Std.)	N5 abs.	(%)	N6 abs.	(%)	PFA abs.	(%)	PAA abs.	(%)	TFT abs.	(%)
0	299	(100)	308	(100)	314	(100)	273	(100)	285	(100)
19	122	(41)	185	(60)	169	(54)	154	(56)	195	(68)
27	75	(25)	124	(40)	127	(40)	135	(49)	171	(60)
43	20	(6.5)	52	(17)	47	(15)	37	(24)	75	(26)
51	6.6	(2.2)	30	(9.7)	18	(5.7)	19	(7)	51	(18)
67	0.1	0	3	(1)	1.5	(0.5)	6.8	(2.5)	39	(14)
75	0		1.5	(0.5)	0.5	(0.2)	3.1	(1.1)	32	(11)
89*	-		0		0		0.7	(0.3)	35	(12)
113	-		-		-		0		19	(6.7)
137	-		-		-		-		14	4.9
185	-		-		-		-		13	4.6

* Therapieende

Tab. 14

Regenerationsgeschwindigkeit (mm2/Std.) unter Therapie mit:

Mittelwerte Versuch I

t (Std.)	N5	N6	PFA	PAA	TFT
t(1) 19	1.34	0.93	1.11	0.9	0.69
t(2) 8	0.85	1.11	0.75	0.47	0.44
t(3) 16	0.51	0.25	0.73	0.9	0.93
t(4) 8	0.18	0.14	0.6	0.2	0.36
t(5) 16	abgh.	abgh.	0.25	0.11	0
t(6) 8	-	-	0.02	0.12	0.17
t(7) 14	-	-	abgh.	0.01	0.01
t(8) 24#	-	-	-	abgh.	0.01
t(9) 24#	-	-	-	-	0.07
t(10) 24# 0.04		-	-	-	-
t(11) 24# 0		-	-	-	-

therapiefrei

Tab. 15

Abb.: 18 **Versuch I, linkes Auge**

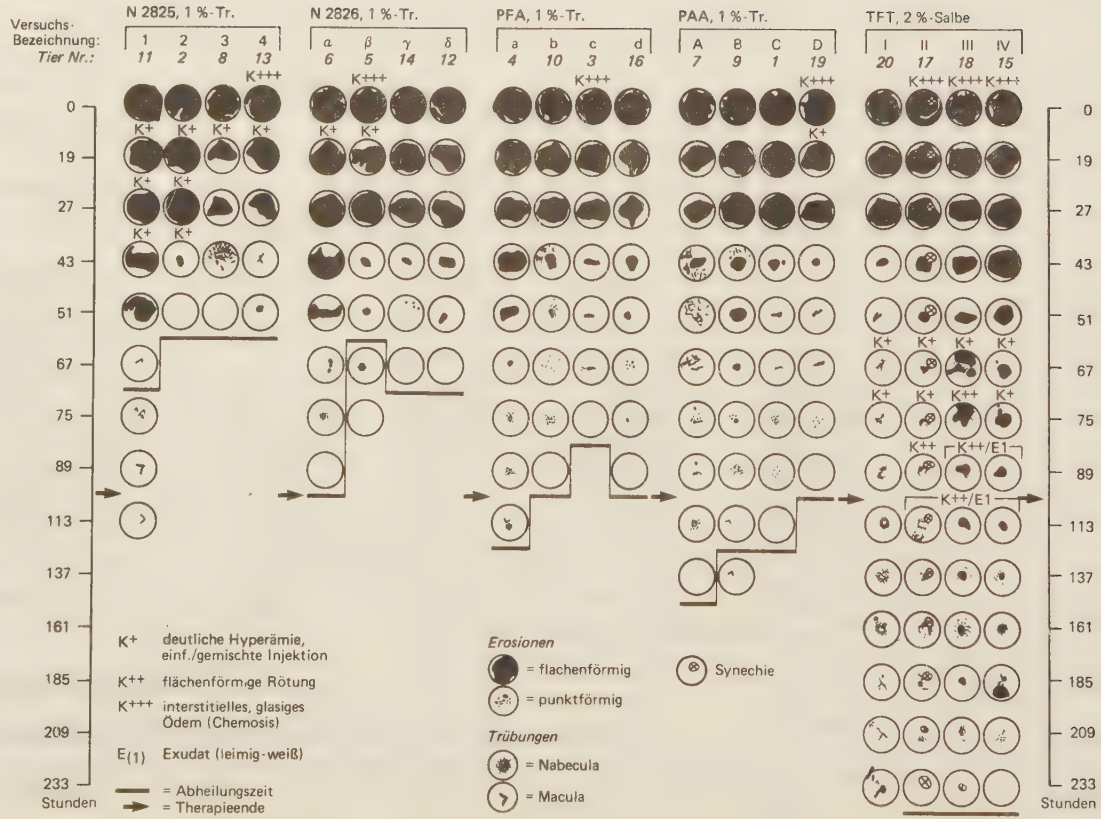
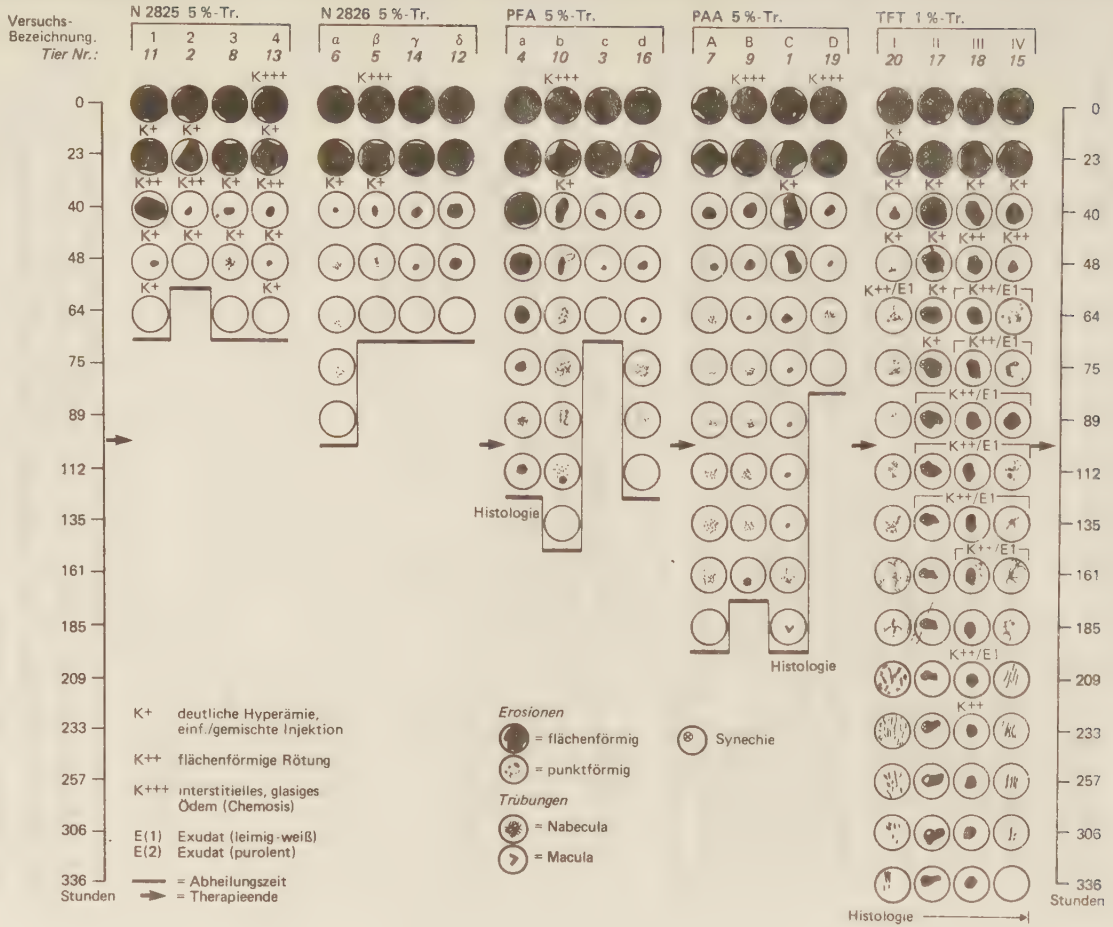


Abb.: 19 Versuch II, rechtes Auge



2. Versuch II

2.1 Durchführung

In dem 2. Versuch wurde mit den 5 % Tropfen von N5, N6, PFA, PAA und den 1 % Tropfen von TFT therapiert. Mit der Therapie wurde am Abend des 2. Versuchstages 2 Stunden nach der Epithelabrasio des rechten Auges begonnen und am 5. Versuchstag nach 89 Stunden mit insgesamt 51 Applikationen abgebrochen. Bis zum 9. Versuchstag (185 Stunden) wurde der Augenstatus photographiert. Der klinische Befund wurde bis zum 15. Versuchstag (330 Stunden) zeichnerisch dokumentiert. 24 Stunden später bzw. 11 Tage nach dem Therapieende wurde die Cornea zur histologischen Aufarbeitung entnommen.

Beobachtungs- und Therapieschema sind in Abb. 5 dargestellt. Den gezeichneten klinischen Augenbefund zeigt die Abb. 19, Seite 87. Die Auswertung der Photos zeigen die jeweiligen Tabellen und Abbildungen zu den Ergebnissen der einzelnen Substanzen.

2.2 Ergebnisse

2.2.1 N5 % Tropfen

a) Klinischer Verlauf

Am 3. Versuchstag nach 48 Stunden (5. Befund) war die Epithelerosion bei Tier 2 und am 4. Versuchstag nach 64 Stunden (6. Befund) bei den restlichen drei Tieren komplikationslos abgeheilt.

Nach 23 Stunden kam es bis zur Abheilung der Erosion bei allen Tieren zu einer ausgeprägten vaskulären Reaktion der Konjunktiven.

b) Abheilungsverlauf

Abb. 20 u. 21 sowie Tab. 16 u. 17 zeigen den Verlauf.

Der anfängliche Epitheldefekt lag im Mittel bei 99 % der Trepanfläche. Die Tiere 2, 3 und 4 zeigten einen gemeinsamen exponentialfunktionsähnlichen Abheilungsverlauf. Die V(reg) konnten jeweils durch eine Gerade idealisiert werden. Der langsamere Abheilungsverlauf bei Tier 1 begründet sich auf die relativ niedrige V(reg) in der t(1)-Phase. Der weitere Verlauf entspricht den anderen Tieren. Da am 4. Versuchstag nur noch bei Tier 3 ein Epitheldefekt vorhanden war und es während der Dauerapplikationsphase t(5) zu einer Zunahme des Epitheldefektes um 2 % der Ausgangsfläche kam, könnte dies ein Hinweis auf eine toxische Schädigung auf das regenerierende Epithel bei einer längeren Applikation durch 5 % N5 Tropfen sein. Andererseits scheint der gesamte Abheilungsverlauf bei den anderen Tieren unbeeinflußt zu sein.

Abb.: 20

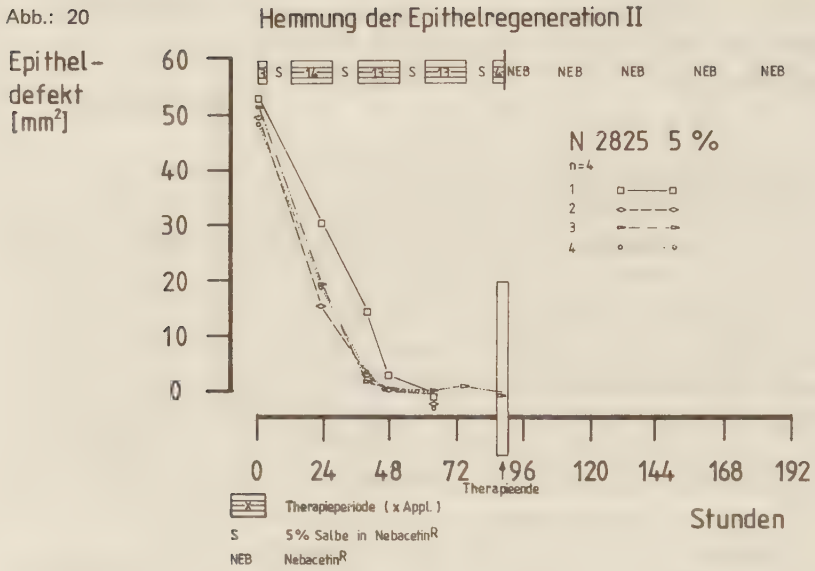
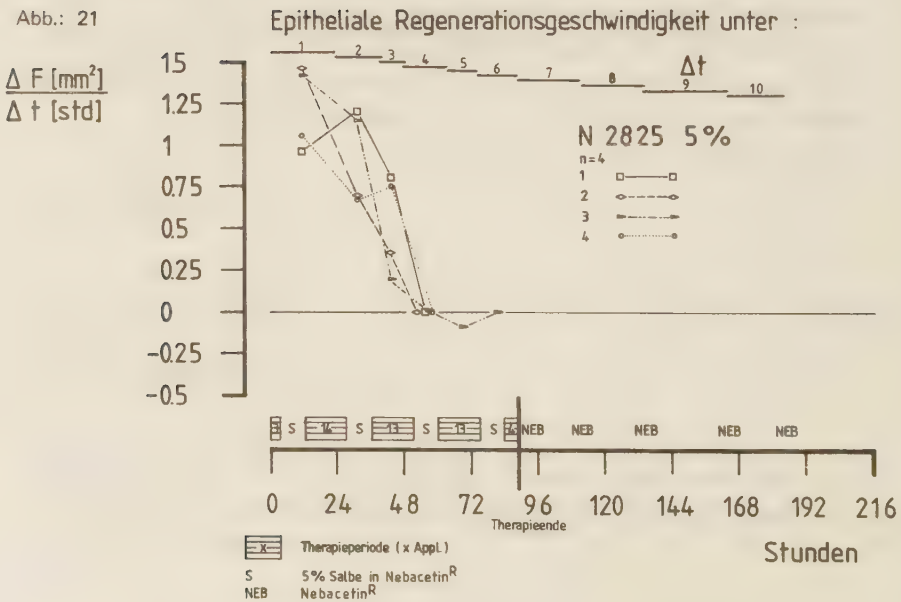

Hemmung der Epithelregeneration II
Epithel-defekt [mm²]
60
50
40
30
20
10
0
S
NEB
N 2825 5 %
n=4
1
2
3
4
0
24
48
72
96
120
144
168
192
Therapieende
Stunden
Therapieperiode (x Appl.)
5% Salbe in Nebacetin®
Nebacetin®

Abb.: 21


Epitheliale Regenerationsgeschwindigkeit unter :
Δ F [mm²] / Δ t [std]
15
1.25
1
0.75
0.5
0.25
0
-0.25
-0.5
Δt
N 2825 5%
n=4
1
2
3
4
S
NEB
0
24
48
72
96
120
144
168
192
216
Therapieende
Stunden
Therapieperiode (x Appl.)
5% Salbe in Nebacetin®
Nebacetin®

Epitheldefekt (cm2) unter der Therapie mit:

N5 5%ige Tropfen

Zeit (std.)	Tier 1 abs. (%)	Tier 2 abs. (%)	Tier 3 abs. (%)	Tier 4 abs. (%)
0	367 (100)	343 (100)	357 (100)	302 (100)
23	211 (57)	107 (31)	133 (37)	132 (44)
40	67 (18)	23 (6.7)	15 (4.2)	25 (8.3)
48	22 (6)	2.7 (0.8)	3.9 (1.1)	3.7 (1.2)
64	0	0	1.1 (0.3)	0
75	-	-	8.1 (2.3)	-
89*	-	-	0	-
112	-	-	-	-

* Therapieende

Tab. 16

Regenerationsgeschwindigkeit (mm2/Std.) unter Therapie mit:

N5 5%ige Tropfen

t (std)	Tier 1	Tier 2	Tier 3	Tier 4
t(1) 23	0.98	1.49	1.42	1.07
t(2) 17	1.23	0.71	1.15	0.9
t(3) 8	0.82	0.37	0.21	0.39
t(4) 16	abgh.	abgh.	0.03	abgh.
t(5) 11	-	-	-0.09	-
t(6) 14	-	-	abgh.	-

Tab. 17

2.2.2 N6 5% Tropfen

a) Klinischer Verlauf

Am 4. Versuchstag nach 64 Stunden (6. Befund) war die corneale Erosion bei 3 Tieren beta, gamma und delta abgeheilt. Bei Tier alpha war die Epitheldecke erst am 5. Versuchstag nach 83 Stunden (8. Befund) geschlossen, nachdem in den drei vorherigen Befunden nur noch wenige stecknadelkopfgroße ungleichmäßig lokalisierte Erosionen beobachtet wurden. Da diese Erosionen noch innerhalb der Therapiezeit abheilten, ist eine toxische Wirkung der 5 % N6 Tropfen nicht anzunehmen.
Die Therapie mit der Substanz führte nach 40 Stunden nur zu einer geringen konjunktivalen Nebenwirkung bei zwei Tieren.

b) Regenerationsverlauf

Abb. 22 u. 23 und Tab. 18 u. 19 zeigen den Verlauf.

Der anfängliche Epitheldefekt war im Mittel mit 105 % größer als die Trepanfläche. Die Abnahme des Epitheldefektes schien bei allen Tieren einem relativ engen homogenen Kurvenverlauf zu folgen. Auch in der Dauerapplikationsphase t(3) konnte kein systematischer Einfluß gesehen werden, so daß der Regenerationsverlauf offensichtlich durch die 5 % N6 Tropfen nicht beeinflußt wurde.

Abb.: 22

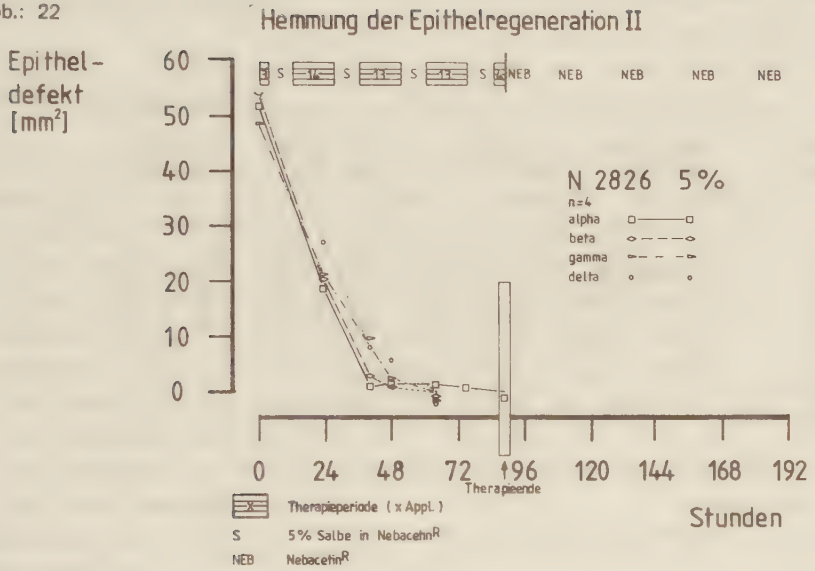
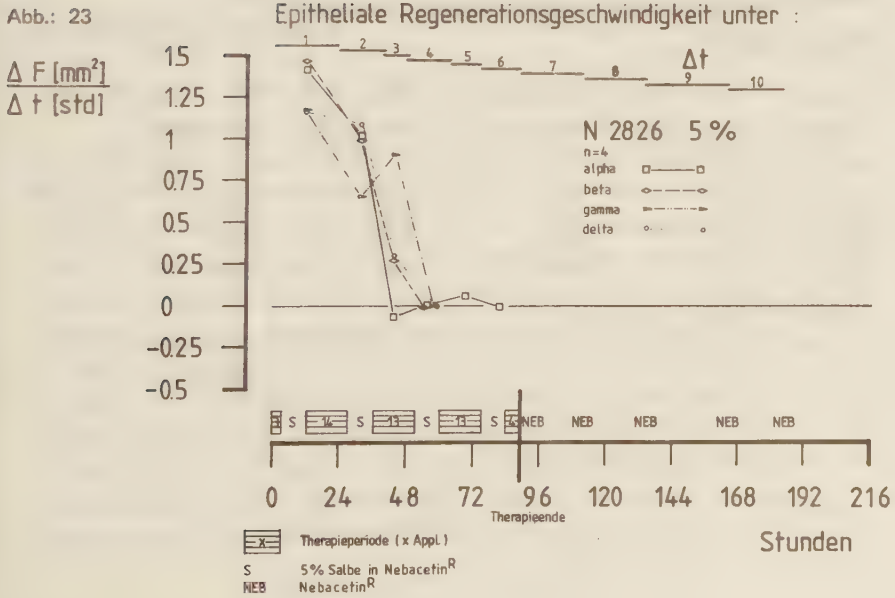

Hemmung der Epithelregeneration II
Epithel-defekt [mm²]
60
50
40
30
20
10
0
S
NEB
N 2826 5 %
n=4
alpha
beta
gamma
delta
0
24
48
72
96
120
144
168
192
Therapieende
Stunden
Therapieperiode (x Appl.)
5% Salbe in Nebacetin R
Nebacetin R

Abb.: 23


Epitheliale Regenerationsgeschwindigkeit unter :
Δ F [mm²] / Δ t [std]
15
1.25
1
0.75
0.5
0.25
0
-0.25
-0.5
Δt
N 2826 5 %
n=4
alpha
beta
gamma
delta
S
NEB
0
24
48
72
96
120
144
168
192
216
Therapieende
Stunden
Therapieperiode (x Appl.)
5% Salbe in Nebacetin R
Nebacetin R

Epitheldefekt (m2) unter der Therapie mit:

N6 5 %ige Tropfen

Zeit (std)	Tier alpha abs. (%)	Tier beta abs. (%)	Tier gamma abs. (%)	Tier delta abs. (%)
0	359 (100)	379 (100)	341 (100)	380 (100)
23	131 (36)	141 (37)	149 (44)	192 (51)
40	7.9 (2.2)	23 (6.1)	71 (21)	58 (15)
48	11 (3.1)	7.7 (2)	20 (5.9)	40 (11)
64	11 (3.1)	0	0	0
75	5.3 (1.5)	-	-	-
89*	0	-	-	-
112	-	-	-	-

* Therapieende

Tab. 18

Regenerationsgeschwindigkeit (mm2/Std.) unter Therapie mit:

N6 5%ige Tropfen

t (std)	Tier alpha	Tier beta	Tier gamma	Tier delta
t(1) 23	1.43	1.5	1.2	1.18
t(2) 17	1.04	1	0.67	1.14
t(3) 8	-0.06	0.28	0.92	0.31
t(4) 16	0	abgh.	abgh.	abgh.
t(5) 11	0.08	-	-	-
t(6) 14	abgh.	-	-	-

Tab. 19

2.2.3 PFA 5 % Tropfen

a) Klinischer Verlauf

Am 4. Versuchstag nach 64 Stunden (6. Befund) war die Erosion bei Tier c komplikationslos abgeheilt. Nach dem Therapieende folgten am 6. Versuchstag nach 112 Stunden (9. Befund) Tier a und d und am 7. Versuchstag nach 135 Stunden (10. Befund) Tier b. Die drei Tiere a, b und d zeigten bei den letzten drei Befunden multiple, stecknadelkopfgroße, punktförmige Erosionen.
Dies scheint einer toxischen Wirkung auf die Regeneration des Corneaepithels unter einer längeren Therapie mit 5 % PFA Tropfen zu entsprechen, da diese Erosionen erst nach dem Therapieende abheilten.
Die Therapie führte zu keiner nennenswerten konjunktivalen Nebenwirkung.

b) Regenerationsverlauf

Abb. 24 u. 25 sowie Tab. 20 u. 21 zeigen den Verlauf.

Der anfängliche Epitheldefekt entsprach der Trepanfläche. Der Regenerationsverlauf von Tier c schien unbeeinflußt zu sein. Die Tiere b und d zeigten nach 40 Stunden (4. Befund) einen parallelen, leicht verzögerten Kurvenverlauf, während die Erosion bei Tier a insgesamt langsamer abheilte. In der Dauerapplikationsphase t(3) lagen die V(reg) bei beiden Tieren b und d mit 0.37 bzw. 0.25 mm2/Std. im Vergleich zu der t(4)-Phase mit der nächtlichen 8-stündigen Applikationspause sehr niedrig. Der Defekt bei Tier a nahm in dieser Phase von 40 auf 44 % der Ausgangsfläche zu. Dies führte zu einer Verlängerung der Abheilzeiten bei allen drei Tieren. Offensichtlich kam es

unter der Therapie mit den 5 % PFA Tropfen zu einer geringen unterschiedlichen dosisabhängigen epithelialen Regenerationshemmung bei drei Tieren.

c) Histologie

Abb. 1 im Anhang I zeigen den histologischen Befund der rechten Cornea des Tieres a am 15. Versuchstag, 11 Tage nach dem Therapieende.
Befund: Gering unruhiges annähernd normal angeordnetes 4-5 schichtiges Epithel mit hochprismatischen basalen Matrixzellen. Normal gepacktes Stroma mit regelrechter Zellzahl.
Diagnose: Annähernd vollständige Wiederherstellung eines noch gering aktivierten Epithels, klinisch: nach Epithelabrasio.

Abb.: 24

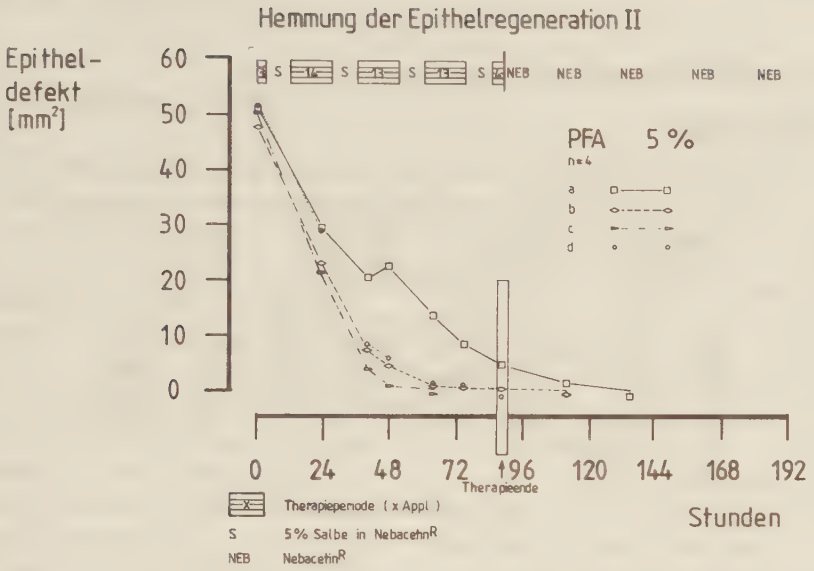
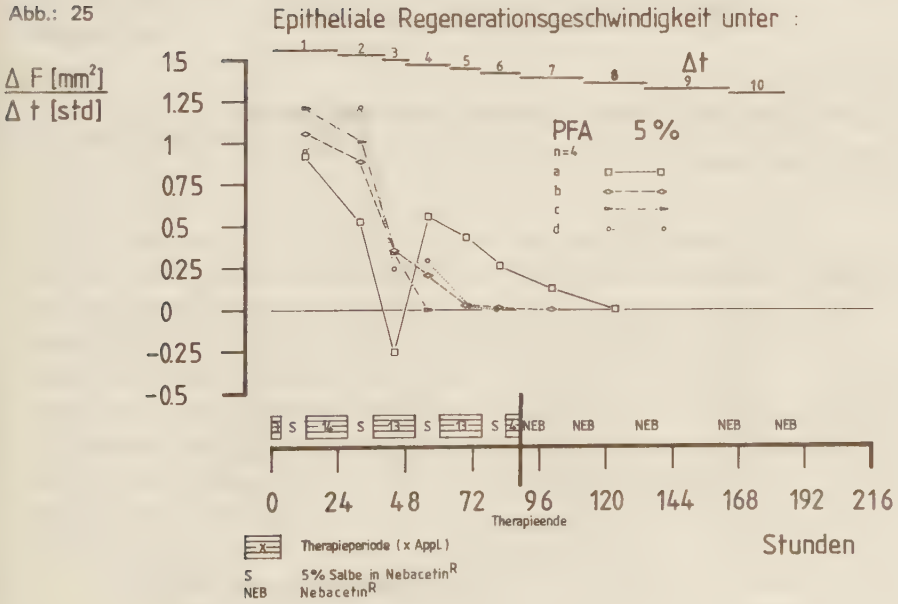

Hemmung der Epithelregeneration II
Epithel-defekt [mm²]
60
50
40
30
20
10
0
S
NEB
PFA 5 %
n=4
a
b
c
d
0 24 48 72 96 120 144 168 192
Therapieende
Stunden
Therapieperiode (x Appl)
5% Salbe in Nebacetin R
Nebacetin R

Abb.: 25


Epitheliale Regenerationsgeschwindigkeit unter :
Δ F [mm²] / Δ t [std]
1.5
1.25
1
0.75
0.5
0.25
0
-0.25
-0.5
Δt
PFA 5 %
n=4
a
b
c
d
S
NEB
0 24 48 72 96 120 144 168 192 216
Therapieende
Stunden
Therapieperiode (x Appl)
5% Salbe in Nebacetin R
Nebacetin R

Epitheldefekt (cm2) unter der Therapie mit:

PFA 5%ige Tropfen

Zeit (std.)	Tier a abs. (%)	Tier b abs. (%)	Tier c abs. (%)	Tier d abs. (%)
0	354 (100)	329 (100)	348 (100)	357 (100)
23	204 (58)	158 (48)	148 (43)	202 (57)
40	142 (40)	51 (16)	29 (8.3)	56 (16)
48	154 (44)	31 (9.4)	7.2 (2.1)	42 (12)
64	92 (26)	6.8 (2.1)	0	8.4 (3.4)
75	57 (16)	0	-	7.1 (2)
89*	33 (9.3)	-	-	0
112	10 (2.8)	-	-	-
135	0	-	-	-
161	-	-	-	-

* Therapieende

Tab. 20

Regenerationsgeschwindigkeit (mm2/Std.) unter Therapie mit:

PFA 5 %ige Tropfen

t (Std.)	Tier a	Tier b	Tier c	Tier d
t(1) 23	0.94	1.07	1.24	0.98
t(2) 17	0.53	0.91	1.02	1.24
t(3) 8	-0.25	0.37	0.4	0.25
t(4) 16	0.57	0.22	abgh.	0.3
t(5) 11	0.46	0.04	-	0.02
t(6) 14	0.27	0.02	-	abgh.
t(7) 23#	0.14	abgh.	-	-
t(8) 23#	abgh.	-	-	-

\# therapiefrei

Tab. 21

2.2.4 PAA 5 % Tropfen

a) Klinischer Verlauf

Vor dem Therapieende war nur bei Tier D der corneale Defekt am 4. Versuchstag nach 75 Stunden (7. Befund) abgeheilt. Am 8. Versuchstag nach 161 Stunden (11. Befund) folgte Tier B und am 9. Versuchstag nach 185 Stunden (1. Befund) die Tiere A und C.
Auffallend war, daß bei allen vier Tieren, nachdem die artefizielle Erosion bis auf Tier C schon vor dem Therapieende geschlossen war, unterschiedlich lange, multiple stecknadelkopfgroße Erosionen bis zur endgültigen Abheilung zu beobachten waren.
Diese punktförmigen Epithelaufbrüche bzw. Erosionen müssen als eine toxische Wirkung einer längeren 5 %igen PAA-Therapie auf die Regeneration des cornealen Epithels angesehen werden.
Es traten keine nennenswerten konjunktivalen Nebenwirkungen auf.

b) Regenerationsverlauf

Abb. 26 u. 27 sowie Tab. 22 u. 23 zeigen den Verlauf.

Der anfängliche Epitheldefekt lag im Mittel bei 97 % der Trepanfläche. Der Regenerationsverlauf von Tier D schien nicht negativ beeinflußt zu sein. Nach 23 Stunden verzögerte sich deutliche die Abnahme des Defektes bei den restlichen drei Tieren. Obwohl in der t(2)-Phase eine 8-stündige Applikationspause vorlag, waren die V(reg) von Tier A und C mit 0.68 bzw. 0.38 mm2/Std. vergleichsweise sehr niedrig. In der t(3)-Dauerapplikationsphase fielen

die V(reg) von den Tieren A, C und B dann auch erheblich ab. Es kam nur zu einer geringen Abnahme der Erosion. Bei Tier C zeigte sich in der nächsten 8-stündigen Applikationspause t(4) wieder eine Zunahme der V(reg), während der Defekt bei Tier A und B weiterhin nur langsam abnahm. In der t(5)-Dauerapplikationsphase kam es bei den gleichen Tieren erneut zu einer geringeren Defektabnahme und in der nächsten Phase zu einem Stillstand der Regeneration trotz nächtlicher Applikationspause. Bei Abbruch der Therapie zeigte Tier A noch 1.4 %, Tier B noch 2.2 % und Tier C noch 3.4 % der Defektfläche bezogen auf die jeweilige Ausgangsfläche. Es kam nur zu einer langsam fortschreitenden Abheilung.

Somit führte die Therapie mit den 5 % PAA-Tropfen einerseits zu einer direkten dosisabhängigen Hemmung der Epithelregeneration und andererseits auch zu einer anhaltenden, vermutlich kumulativ toxischen Wirkung auf das regenerierende Epithel.

c) Histologie

Die Cornea von Tier C wurde histologisch aufgearbeitet. Abb. 2 und 3 im Anhang I zeigen die Histologie der Cornea von Tier C am 15. Versuchstag, 6 Tage nach der klinischen Abheilung.

Befund: Das maximal dreischichtige Epithel ist unregelmäßig angeordnet. Die basale Matrixschicht besteht überwiegend aus unterschiedlich breiten hochprismatischen Epithelzellen mit der Basalmembran entrückter Zellkerne. Regelmäßig finden sich frische Zellnekrosen und vereinzelt Mitosen in der basalen Zellschicht. Die Zellen der 1. und 2. Schicht haben stärkere polymorphe und teilweise hyperchromatische Kerne sowie zahlreiche intrazytoplasmatische Vakuolen. Auffallend ist die stärkere Bildung von Interzellularsubstanz einiger Zellen in der 2. Schicht. Die

voll ausgebildete Basalmembran folgt einer unregelmäßig aufgeworfenen Stromaoberfläche mit einer gering Zell- und Substanzvermehrung der oberen Stromaschicht.

Diagnose: Sich regenerierendes, maximal dreischichtiges Epithel mit deutlichen strukturellen Hinweisen auf eine starke Beeinträchtigung der Regeneration. Hinweise auf eine vermutlich erhöhte Proliferation mit stärkeren subzellulären Cytoplasma- und Zellkernveränderungen.

Abb.: 26

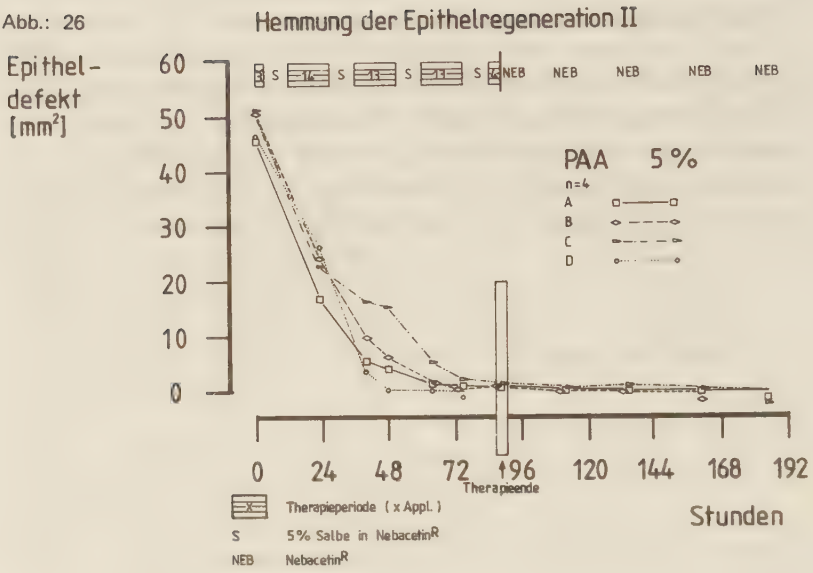
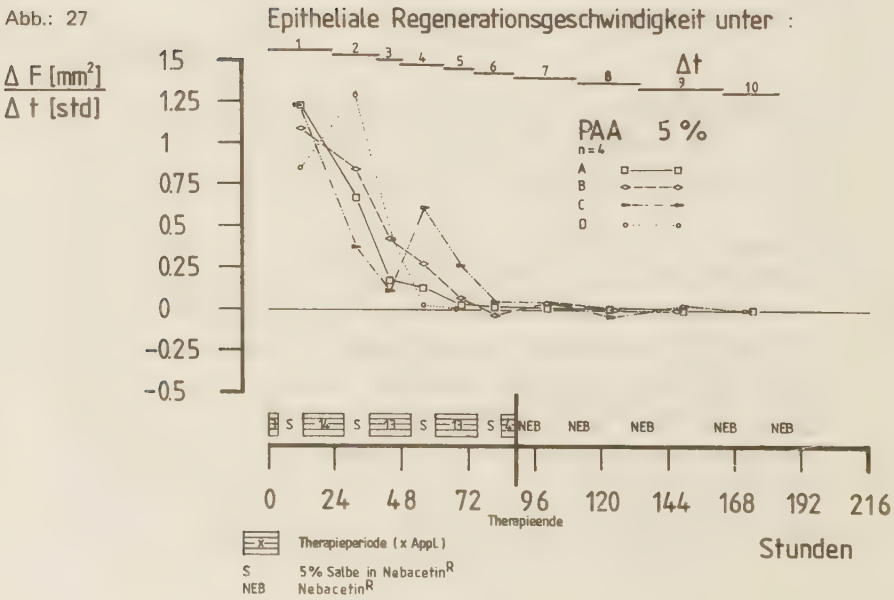

Hemmung der Epithelregeneration II
Epithel-defekt [mm²]
60
50
40
30
20
10
0
S
NEB
PAA 5 %
n=4
A
B
C
D
0
24
48
72
196
120
144
168
192
Therapieende
Stunden
Therapieperiode (x Appl.)
5% Salbe in Nebacetin R
Nebacetin R

Abb.: 27


Epitheliale Regenerationsgeschwindigkeit unter :
Δ F [mm²] / Δ t [std]
1.5
1.25
1
0.75
0.5
0.25
0
-0.25
-0.5
Δt
PAA 5 %
n=4
A
B
C
D
S
NEB
0
24
48
72
96
120
144
168
192
216
Therapieende
Stunden
Therapieperiode (x Appl.)
5% Salbe in Nebacetin R
Nebacetin R

Epitheldefekt (cm2) unter der Therapie mit:

PAA 5 %ige Tropfen

Zeit (std.)	Tier A abs. (%)	Tier B abs. (%)	Tier C abs. (%)	Tier D abs. (%)
0	315 (100)	350 (100)	356 (100)	322 (100)
23	119 (38)	171 (49)	160 (45)	184 (57)
40	40 (13)	68 (19)	116 (33)	28 (8.7)
48	29 (9.2)	46 (13)	107 (30)	4.3 (1.3)
64	12 (3.8)	13 (3.7)	39 (11)	2.7 (0.8)
75	8 (2.5)	6.1 (1.7)	17 (4.8)	0
89*	4.4 (1.4.)	7.8 (2.2)	12 (3.4)	-
112	3.3 (1)	0.6 (0.2)	6.7 (1.9)	-
135	2.7 (0.9)	0.4 (0.2)	10 (2.8)	-
161	2.7 (0.9)	0	4.6 (1.3)	-
185	0	-	0	-

* Therapieende

Tab. 24

Regenerationsgeschwindigkeit (mm2/Std.) unter Therapie mit:

PAA 5 %ige Tropfen

t (std)	Tier A	Tier B	Tier C	Tier D
t(1) 23	1.24	1.13	1.24	0.87
t(2) 17	0.68	0.86	0.38	1.32
t(3) 8	0.19	0.44	0.13	0.43
t(4) 16	0.15	0.29	0.63	0.02
t(5) 11	0.05	0.09	0.28	abgh.
t(6) 14	0.04	-0.02	0.5	-
t(7) 23#	0.01	0.05	0.04	-
t(8) 23#	0	0	-0.02	-
t(9) 26#	0	abgh.	0.03	-
t(19)24#	abgh.	-	abgh.	-

\# therapiefrei

Tab. 25

2.2.5 TFT 1 % Tropfen

a) Klinischer Verlauf

Am 15. Versuchstag nach 330 Stunden (18. Befund) war der Epitheldefekt nur bei Tier IV abgeheilt. Danach wurde der Versuch abgebrochen. Bei Tier II und III fanden sich noch eine flächenförmige Erosion, die während des ganzen Versuches nur langsam kleiner geworden war. Bei Tier I wurden kleine punkt- und linienförmige Epitheldefekte beobachtet, die seit dem 4. Versuchstag nach 64 Stunden (6. Befund) noch in unterschiedlicher Lokalisation und Ausprägung vorhanden waren. Ähnliche Epithelaufbrüche bzw. Erosionen wurden bei Tier IV beobachtet. Obwohl bei Tier IV die anfängliche artefizielle Erosion am 4. Versuchstag schon nahezu abgeheilt war, vergrößerte sich der Defekt am 5. Versuchstag nochmal erheblich. Dann heilte die Erosion nach dem Therapieende innerhalb von 24 Stunden schnell ab und zeigte im weiteren Verlauf ähnliche Epithelaufbrüche wie bei Tier I.
Am 3. Versuchstag nach 40 Stunden (4. Befund) zeigten sich bei allen Tieren die ersten konjunktivalen Nebenwirkungen, die im weiteren Verlauf besonders bei Tier II, III und IV in eine exsudative Konjunktivitis übergingen. In der Reihenfolge der Tier II, IV und III waren die Nebenwirkungen am 3., 5. und 7. Tag nach dem Therapieende nicht mehr zu beobachten.

Die Therapie mit den 1 % Tropfen führte somit zu einer direkten und vermutlich kumulativen toxischen Wirkung auf die Regeneration des Epithels und zu einer langanhaltenden, starken Konjunktivitis.

b) Regenerationsverlauf

Abb. 28 u. 29 sowie Tab. 26 u. 27 zeigen den Verlauf.

Der anfängliche Epitheldefekt lag im Mittel bei 98 % der Trepanfläche. Auffallend war der jeweils ähnliche Regenerationsverlauf bei den Tieren I und IV bzw. II und III. Nur bei Tier III war anfangs bis zur 40. Stunde (4. Befund) die Defektabnahme mit einer V(reg) von 0.47 mm2/Std. in der t(2)-Phase deutlich verlangsamt. Danach sanken in der Dauerapplikationsphase t(3) bei Tier I und IV die V(reg) leicht ab, während bei Tier II der Defekt von 42 % auf 49 % und bei Tier III von 32 % auf 40 % der jeweiligen Ausgangsfläche wuchs. Diese negative Tendenz setzte sich bis zur 75 Stunde (7. Befund) fort, so daß sich der Defekt bei Tier II auf 64 % und bei Tier III auf 52 % der Ausgangsfläche vergrößert hatte. Ebenfalls nahm der Defekt trotz nächtlicher Applikationspause in der t(4)-Phase bei Tier I von 3.9 % auf 11 % der Ausgangsfläche zu. In der Dauerapplikationsphase t(5) stagnierte die Regeneration bei Tier IV zwischen der 64. Stunde (6. Befund) und 75. Stunde (7. Befund). In der 9-stündigen Applikationspause t(6) nahmen die Flächen bei allen Tieren wieder ab, so daß nach 89 Stunden (8. Befund) zum Therapieende Tier I noch einen Defekt von 7 %, Tier II von 47 %, Tier III von 39 % und Tier IV von 4,5 % der jeweiligen Ausgangsfläche hatte. Nach dem Therapieende nahmen die Defekte nur langsam ab, wobei es bei Tier I und II zu erneuten Epithelaufbrüchen kam. Am 9. Versuchstag nach 185 Stunden (12. Befund) hatte Tier I noch eine Defektfläche von 7 %, Tier II von 26 %, Tier III von 27 % und Tier IV von 1,4 % der jeweiligen Ausgangsfläche.

Unter der Therapie mit 1 % TFT Tropfen kam es somit nach 40 Stunden zum Auftreten einer frühen toxischen, vermutlich individuellen dosisabhängigen Wirkung in Form einer völligen bis zur 75. Stunde anhaltenden Hemmung der Epi-

thelregeneration. Andererseits zeigte sich ein langanhaltender, kumulativ toxischer Effekt nach dem Therapieende in Form einer erheblichen Regenerationsverlangsamung und neuen Epithelaufbrüchen.

c) Histologie

Die Cornea aller vier Tiere wurde histologisch aufgearbeitet. Abb. 4 bis 12 im Anhang I zeigen den histologischen Befund der vier Tiere am 15. Versuchstag, 11 Tage nach dem Therapieende. Zwei Tage vor der Entnahme zeigten die Tiere II und III klinisch noch eine größere zentrale Erosion, während bei Tier I nur noch kleine punktförmige Epitheldefekte nachweisbar waren. Bei Tier IV war die Epitheldecke geschlossen.

Befund von Tier I: Gering unruhiges, annähernd normal geordnetes 3- bis 4-schichtiges Epithel mit vorwiegend hochprismatischen basalen Matrixzellen. Durchgehend ausgebildete unauffällige Basalmembran zwischen dem Epithel und einem in der oberen Schicht leicht gewellten, gering substanzvermehrten Stroma. Stärkeres interstitielles Ödem mit geringer Verbreiterung des Stroma vorwiegend in der Corneamitte.
Diagnose: Weitgehend unauffälliges, annähernd vollständig regeneriertes Epithel mit nicht mehr frischen degenerativen Veränderungen des Stromas.

Befund von Tier II: Über mehrere Millimeter fehlende Epitheldecke über der Stromamitte. Von beiden Rändern sich vorschiebende, wenig organisierte mehrzellige frei flottierende Epithelzungen mit nachfolgendem einschichtigen, anfangs hochprismatischen, später kubischen basalen Matrixepithel mit einzelnen Mitosen. Basalmembran bis dorthin regelmäßig ausgebildet. Verminderte Bildung von Interzellularsubstanz. Mäßiges interstitielles Ödem und geringe

Aktivierung der ortsständigen Fibrozyten sowie einzelner Makrophagen, vorwiegend im epithelentblößten Stroma. Alte breitflächige Synechie mit einem geringen chronisch entzündlichen Infiltrat in der Umgebung im mittleren Corneabereich.
Diagnose: Große zentrale Erosionen bei weitgehend geringer Regenerationstendenz des Epithels mit einer geringen fibroplastischen Entzündung in dem oberflächlichen Stroma. Alte größere Synechie mit einer geringen chronischen fibroplastischen Entzündung.

Befund von Tier III: Über mehrere Millimeter fehlendes Epithel über der Stromamitte. Von beiden Rändern sich vorschiebende mehrzellige, teils frei flottierende organisierte Epithelleisten mit nachfolgendem einschichtigem, anfangs hochprismatischem breitem basalem Matrixepithel mit einzelnen Mitosen. Mäßige Bildung von Interzellularsubstanz mit deutlich ausgebildeter Basalmembran. Stärkeres interstitielles Ödem in dem oberflächlichen freien Stroma mit stärkerer Dehiszenz der kollagenen Stromamatrix. Vereinzelt Makrophagen.
Diagnose: Weitgehend geringe Regenerationstendenz des Epithels mit einer großen zentralen Erosion und einem stärkeren interstitiellen Ödem mit einer gering fibroplastischen Entzündung des Stromas.

Befund von Tier IV: Unregelmäßig angeordnetes 2 bis 3-schichtiges, mäßig regeneriertes Epithel mit vorwiegend hochprismatischen basalen Matrixzellen, vereinzelten Mitosen und einzelnen hydropisch geschwollenen Basalzellen. Basalmembran unregelmäßig ausgebildet. Breites faser- und zellvermehrtes Stroma mit einem geringen interstitiellen Ödem und stärkerer Verwerfung der parallelen Kollagenfasern.
Diagnose: Ungleich fortgeschrittene Regeneration des Epithels. Stärkere stromale fibroplastische Entzündung mit stärkerer Verwerfung des Stromas.

Abb.: 28

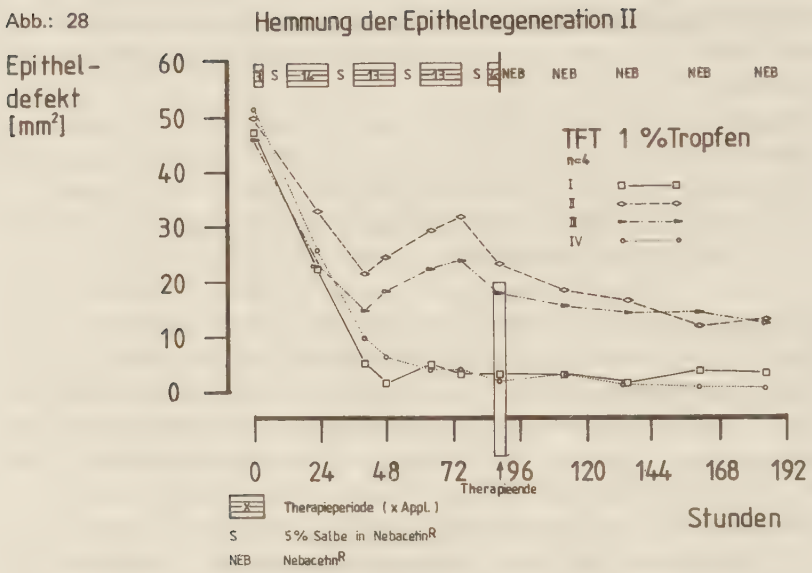
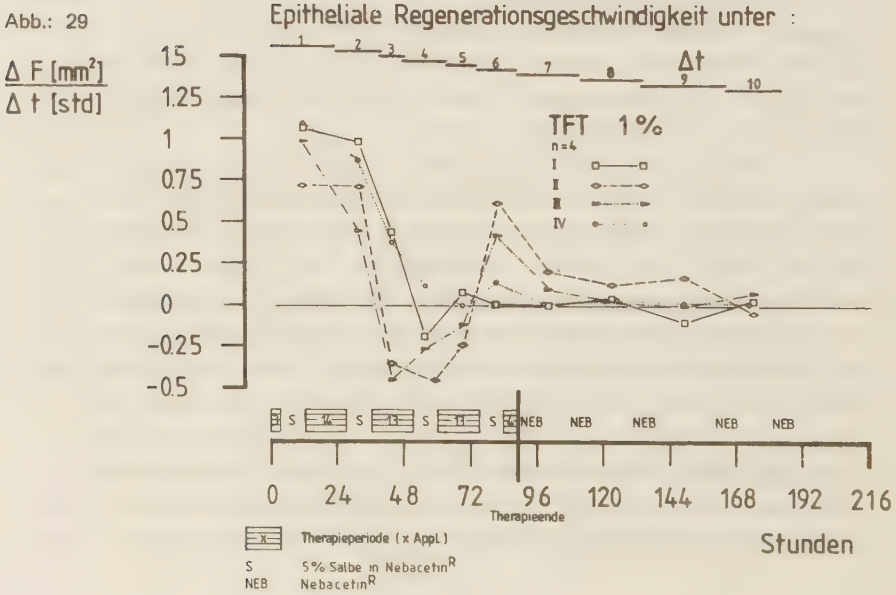

Hemmung der Epithelregeneration II
Epithel-defekt [mm²]
60
50
40
30
20
10
0
S
NEB
TFT 1 %Tropfen
n=4
I
II
III
IV
0
24
48
72
96
120
144
168
192
Therapieende
Stunden
Therapieperiode (x Appl.)
5% Salbe in Nebacetin®
Nebacetin®

Abb.: 29


Epitheliale Regenerationsgeschwindigkeit unter :
Δ F [mm²] / Δ t [std]
1.5
1.25
1
0.75
0.5
0.25
0
-0.25
-0.5
Δt
TFT 1%
n=4
I
II
III
IV
S
NEB
0
24
48
72
96
120
144
168
192
216
Therapieende
Stunden
Therapieperiode (x Appl.)
5% Salbe in Nebacetin®
Nebacetin®

Epitheldefekt (cm2) unter der Therapie mit:

TFT 1 %ige Tropfen

Zeit (std)	Tier I abs.	(%)	Tier II abs.	(%)	Tier III abs.	(%)	Tier IV abs.	(%)
0	330	(100)	347	(100)	319	(100)	355	(100)
23	155	(47)	230	(60)	160	(50)	181	(51)
40	39	(12)	147	(42)	102	(32)	69	(19)
48	13	(3.9)	171	(49)	127	(40)	45	(13)
64	36	(11)	205	(59)	154	(48)	31	(8.7)
75	24	(7.3)	221	(64)	167	(52)	31	(8.7)
89*	23	(7)	163	(47)	126	(39)	16	(4.5)
112	21	(6.4)	127	(37)	106	(33)	18	(5.1)
135	14	(4.2)	116	(33)	102	(32)	11	(3.1)
161	30	(9.1)	85	(24)	100	(31)	7.8	(2.2)
185	23	(7)	91	(26)	87	(27)	4.9	(1.4)

* Therapieende

Tab. 26

Regenerationsgeschwindigkeit (mm2/Std.) unter Therapie mit:

TFT 1 %ige Tropfen

t (std)	Tier I	Tier II	Tier III	Tier IV
t(1) 23	1.09	0.74	1	1.11
t(2) 17	1	0.71	0.47	0.94
t(3) 8	0.45	-0.38	-0.44	0.44
t(4) 16	-0.19	-0.43	-0.25	0.13
t(5) 11	0.14	-0.23	-0.14	0
t(6) 14	0.01	0	0.43	0.15
t(7) 23#	0.01	0.22	0.11	0.02
t(8) 23#	0.5	0.07	0.06	0.05
t(9) 26#	-0.9	0.19	0	0.02
t(10) 24#	0.05	-0.04	0.09	0.02

therapiefrei

Tab. 27

2.3 Vergleich der Substanzgruppen im Versuch II

2.3 Abheilzeiten

Substanz		Wiederholungen (Beobachtungsränge)				mittlere Abheilzeiten (Std.) M ± SE
N5	5% Tr.	5	6	6	6	60 +/- 8
N6	5% "	6	6	6	8	70 +/- 13
PFA	5% "	6	9	9	10	106 +/- 30
PAA	5% "	7	11	12	12	152 +/- 52
TFT	1% "	18	20	20	20	330

Tab. 28

Die Abheilzeiten werden nach dem klinischen Befund aus Abb. 18 ausgewertet. In Tab. 28 werden die Abheilzeiten als Beobachtungsränge und als Mittelwerte mit dem Standardfehler wiedergegeben. Die Ergebnisse sind in Tab. 29 schematisch zusammengefaßt.

Die Therapie mit N5 Tropfen führte zu statistisch signifikanten (2p 0.05) kürzeren Abheilzeiten als die Therapie mit PAA und TFT-Tropfen. Zwischen der Therapie mit N5 und N6 schien kein Unterschied in der Beeinflussung der Abheilzeiten zu bestehen. Obwohl eine Verlängerung der Abheilzeiten im Mittel in der Reihenfolge N6, PFA und PAA offensichtlich war, ließ sich anhand der vorliegenden Stichproben kein Unterschied statistisch sichern. Dagegen führte die Therapie mit 1 % TFT-Tropfen gegenüber den

anderen Substanzen zu wesentlich längeren signifikanten Abheilzeiten, sowie 5 % PAA gegenüber 5 % N5 und N6 Tropfen.

1 % TFT-Tropfen müssen deshalb bei 15x täglichen Applikationen als gesichert toxisch auf die Epithelregeneration gelten. Für 5 % PAA ist eine stärkere vermutlich toxische Verlängerung des Regenerationsablaufes zu erwarten.

Tab. 29: Tabellarische Zusammenstellung des Vergleiches der Abheilzeiten im Versuch 2

	N5 5 % Tr.		
5 % Tr. N 6	0	N6 5 % Tr.	
5 % Tr. PFA	+	+	PFA 5 % Tr.
5 % Tr. PAA	**	*	+ PAA 5 % Tr.
1 % Tr. TFT	**	**	** **

WILCOXON-Test
* $2p \leq 0.10$
** $2p \leq 0.05$

\+ Tendenz längerer Abheilzeiten von links nach rechts

2.3.3 Abheilungsverlauf

Abb. 30 und 31 sowie Tab. 30 und 31 zeigen den Verlauf der Regeneration anhand der Mittelwerte für die einzelnen Substanzguppen.
Zur statistischen Prüfung wurden die jeweiligen Einzelwerte im WILCOXON-Test für zwei Stichproben mit den Vertrauensgrenzen von $2p \leqslant 0.1$ bzw. $2p \leqslant 0.05$ verglichen.
Eine tabellarische Zusammenfassung zeigt Abb.33, Seite 125.

Die Ausgangsflächen lagen mit 97 % der möglichen Trepanfläche bei PAA und mit 104 % bei N6 vergleichsweise eng zusammen. Die mögliche V(reg) in der t(1)-Phase ist in der TFT-Gruppe signifikant ($2p \leqslant 0.1$) geringer als in der N6-Gruppe, was vermutlich trotz ungleicher Ausgangsflächen auf eine Hemmung der Regeneration zurückzuführen ist. Die Flächenkurve von N5 zu N6 sowie von PFA zu PAA zeigen jeweils einen ähnlichen parallelen Verlauf. Die Abnahme der Flächenkurve von TFT ist nach 23 Stunden schon deutlich verlangsamt. Die Flächenkurve der Phosphatanaloga N5 und N6 folgt annähernd einer abnehmenden Exponentialfunktion. Die fast lineare Abnahme der mittleren V(reg) von N5 und N6 entspricht einer Geraden. Ein hemmender Einfluß dieser Substanzen ist somit nicht nachweisbar.
Am 3. Versuchstag nach 40 Stunden (4. Befund) kommt es in der t(3)-Phase mit durchgehender Therapie zu einer Verlangsamung der V(reg) von PFA, PAA und TFT, wodurch die mittlere Läsion am geringsten in der TFT-Gruppe abheilt.
Nach 48 Stunden (5. Befund) finden sich signifikant ($2p \leqslant 0.1$) größere mittlere Läsionen in der PFA-, PAA- und TFT-Gruppe im Vergleich zu der N5-Gruppe.
Nach 64 Stunden (6. Befund) bestand hinsichtlich des Epitheldefektes eine Signifikanz ($2p \leqslant 0.1$) von PAA und TFT gegenüber den Phosphatanaloga, wobei sich die Läsion im Mittel unter der TFT-Therapie von der 48. zur 75. Stunden vergrößerte. Ebenso zeigte sich eine Signifikanz von PFA gegenüber N5 zu diesem Zeitpunkt.

Am 6. Versuchstag nach 112 Stunden (9. Befund) 24 Stunden nach Therapieabbruch ist der mittlere Epitheldefekt in der TFT-Gruppe signifikant ($2p \leqslant 0.1$) größer als in der PAA- und PFA-Gruppe.
Nach weiteren 24 Stunden (10. Befund) hatte die PAA-Gruppe noch signifikante ($2p \leqslant 0.1$) größere Epitheldefekte als die PFA-Gruppe. Die mittlere Läsion in der TFT-Gruppe mit 18 % der Ausgangsfläche und einer mittleren V(reg) von 0.03 mm/Std. heilte nur sehr langsam ab.

Somit führt die Therapie mit der 5 % Tropfenlösung in der PFA- und PAA-Gruppe während der Applikationsphase zu einer signifikanten ($2p \leqslant 0.10$) Hemmung der Epithelregeneration, die sich in der PAA-Gruppe deutlicher mit einer signifikanten Abheilungsverlängerung nach dem Therapieende zeigte. Einerseits kann dies auf eine anfangs stärkere direkt hemmende Wirkung, andererseits auf einen kumulativ toxischen Effekt hinweisen.
Eine schwere toxische Regenerationshemmung des Epithels war unter der Therapie mit 1 % TFT-Tropfen während der Therapiephase nach 40 Stunden nachweisbar und führte über einen vermutlich kumulativen Effekt zu einer starken Regenerationshemmung über den Beobachtungszeitraum hinaus.

Abb. 30:

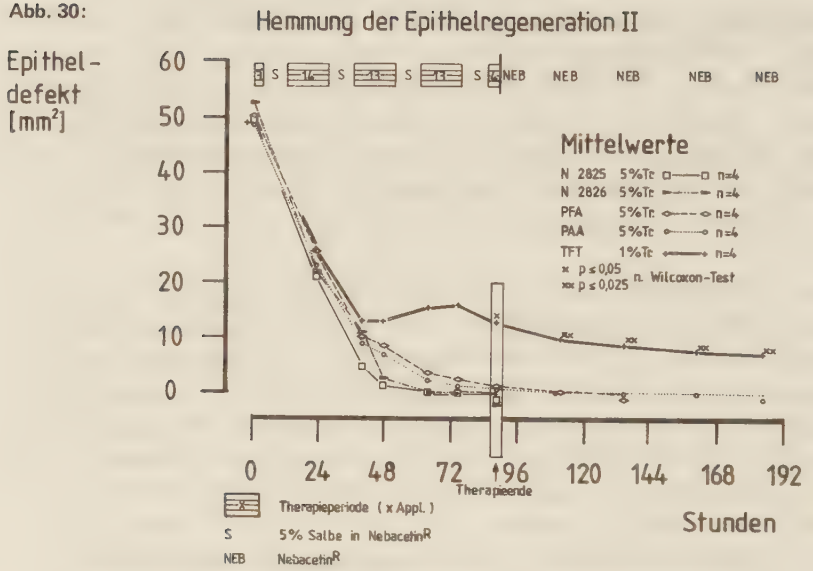
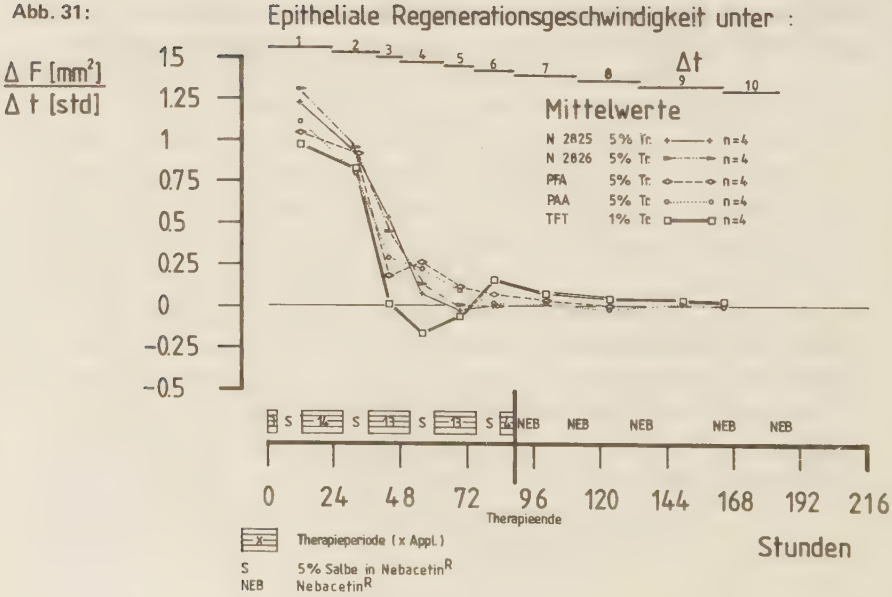

Hemmung der Epithelregeneration II
Epithel-defekt [mm²]
60
50
40
30
20
10
0
S
NEB
Mittelwerte
N 2825 5%Tr n=4
N 2826 5%Tr n=4
PFA 5%Tr n=4
PAA 5%Tr n=4
TFT 1%Tr n=4
x p ≤ 0,05
xx p ≤ 0,025 n. Wilcoxon-Test
0 24 48 72 96 120 144 168 192
Therapieende
Stunden
Therapieperiode (x Appl.)
S 5% Salbe in Nebacetin®
NEB Nebacetin®

Abb. 31:


Epitheliale Regenerationsgeschwindigkeit unter :
Δ F [mm²] / Δ t [std]
15
1.25
1
0.75
0.5
0.25
0
-0.25
-0.5
Δt
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
Mittelwerte
N 2825 5% Tr n=4
N 2826 5% Tr n=4
PFA 5% Tr n=4
PAA 5% Tr n=4
TFT 1% Tr n=4
S
NEB
0 24 48 72 96 120 144 168 192 216
Therapieende
Stunden
Therapieperiode (x Appl.)
S 5% Salbe in Nebacetin®
NEB Nebacetin®

Epitheldefekt (cm2) unter der Therapie mit:

Mittelwerte Versuch II

Zeit (std)	N5 abs.	(%)	N6 abs.	(%)	PFA abs.	(%)	PAA abs.	(%)	TFT abs.	(%)
0	342	(100)	365	(100)	347	(100)	336	(100)	338	(100)
23	146	(46)	153	(42)	178	(51)	158	(47)	182	(54)
40	33	(9.6)	40	(11)	70	(20)	63	(19)	89	(26)
48	8	(2.3)	20	(5.5)	59	(17)	47	(14)	89	(26)
64	0.3	(0)	2.7	(0.7)	27	(7.8)	16	(4.8)	107	(32)
75	2	(0.6)	1.3	(0.4)	17	(4.6)	7.9	(2.4)	111	(33)
89*	0		0		8.7	(2.5)	6	(1.8)	82	(24)
112	-		-		2.6	(0.7)	2.7	(0.8)	68	(20)
135	-		-		0		3.3	(1)	61	(18)
161	-		-		-		1.8	(0.5)	56	(17)
185	-		-		-		0		51	(15)

* Therapieende

Tab. 30

Regenerationsgeschwindigkeit (mm2/Std.) unter Therapie mit:

Mittelwerten Versuch II

t (std)	N5	N6	PFA	PAA	TFT
t(1) 23	1.24	1.33	1.06	1.12	0.99
t(2) 17	0.95	0.97	0.93	0.81	0.78
t(3) 8	0.54	0.41	0.19	0.3	0.02
t(4) 16	0.08	0.16	0.27	0.24	0.16
t(5) 11	0.03	0.02	0.13	0.1	0.06
t(6) 14	abgh.	abgh.	0.04	0.02	0.17
t(7) 23#	-	-	abgh.	0.03	0.09
t(8) 23#	-	-	-	0	0.05
t(9) 26#	-	-	-	0.02	0.03
t(10) 24#	-	-	-	abgh.	0.03

\# therapiefrei

Tab. 31

3. Vergleich beider Versuche

Der interindividuelle Vergleich in den jeweiligen Substanzgruppen ist durch die Versuchsplanung möglich, um die Frage der dosisabhängigen Regenerationshemmung zu untersuchen. Im Versuch I wurde zunächst das linke Auge mit der niedrigeren Substanzdosis (1 % Tropfenlösungen für N5, N6, PFA, PAA und 2 % Salbe für TFT) behandelt und vier Wochen später im Versuch II das rechte Auge mit der höheren Substanzdosis (5 % Tropfenlösung für N5, N6, PFA, PAA und 1 % Tropfenlösung für TFT).
Der 2. und 3. Befund am 2. Versuchstag nach 19 bzw. 27 Stunden im Versuch I wird als Mittelwert zusammengefaßt und dem 2. Befund nach 23 Stunden im Versuch II zugeordnet (siehe Abb. 5, Seite 60). Die zeitliche Abweichung der jeweiligen Befundungen in den beiden Versuchen von max. 5 Stunden wurde vernachlässigt. Die einzelnen gepaarten Werte der jeweiligen Substanzgruppen aus Versuch I und II können wegen der niedrigen Stichprobenzahl von 4 Tieren nur interpretiert werden. Zwischen den Substanzgruppen wurde die Werte auf eine statistisch verlässliche Unterscheidung hin mit Hilfe des WILCOXON-Test für zwei Stichproben in einem Vertrauensbereich von $2p \leqslant 0.1$ bzw. $2p \leqslant 0.05$ geprüft.

3.1 Konjunktivale Reaktion

Die Therapie mit 1 % bzw. 5 % PFA und PAA Tropfen führte zu keiner nennenswerten Nebenwirkung an der konjunktivalen Schleimhaut.
Eine geringe konjunktivale Reaktion war am Anfang bei der 1 % und 5 % N6 Therapie ohne eine Dosisabhängigkeit zu sehen.
Die 5 % N5 Therapie führte stärker als die 1 % N5 Therapie

zu einer mäßigen Konjunktivitis bis zur Abheilung der cornealen Wunde, wobei es sich um eine dosisabhängige Nebenwirkung der Substanz in dem direkten Paarvergleich handeln dürfte.
Stärker und früher (nach 40 Std., 3. Befund) kam es unter den 1 % TFT Tropfen gegenüber der 2 % TFT Salbe zu einer über das Therapieende hinausgehenden schweren exsudativen Konjunktivitis, die in der 1 % TFT Gruppe im Mittel 4 Tage nach dem Therapieende, 3 Tage später als in der 2 % TFT-Salben-Gruppe, abheilte.

Somit ist eine toxische, vermutlich auch kumulative toxische Nebenwirkung, die von der Galenik bzw. von der Substanzdosis abhängt, mit Sicherheit unter einer TFT-Therapie mit 15 Applikationen/Tag an der konjunktivalen Schleimhaut zu erwarten.

3.2 Abheilzeit

Die Abheilzeiten sind dem klinischen Befund Abb. 18 und 19, Seite 86 u. 87 entnommen und werden als Beobachtungsränge in Tab. 32 angegeben.

Substanz		Wiederholungen (Ränge)			
N5	1 % Tropfen	6	5	5	5
N5	5 % Tr.	6	5	6	6
N6	1 % Tr.	8	5	6	6
N6	5 % Tr.	8	6	6	6
PFA	1 % Tr.	9	8	7	8
PFA	5 % Tr.	9	10	6	9
PAA	1 % Tr.	10	9	9	8
PAA	5 % Tr.	12	11	12	7
TFT	2 % Salbe	14	14	14	18
TFT	1 % Tr.	18	20	20	20

Tab. 32

3.2.1 Paarweiser Vergleich der Abheilzeiten zu der jeweiligen Substanz

In der N5 Gruppe heilten zwei Augen und in der N6 Gruppe ein Auge im Paarvergleich um eine Beobachtung später ab, so daß eine dosisabhängige Wirkung nicht nachzuweisen war.
In der PFA Gruppe verlängerte sich die Abheilzeit zwar bei einem Tier um zwei Ränge, bei einem anderen um einen Rang, blieb aber bei einem Tier gleich und verschlechterte sich um einen Rang bei dem vierten Tier, so daß keine dosisabhängige Wirkung nachzuweisen war.
In der PAA Gruppe kam es zu einer deutlichen Abheilungsverlängerung bei drei Tieren um 3 bzw. 2 Beobachtungsränge, während es bei dem vierten Tier zu einer vorzeitigen Abheilung um einen Rang kam.
Einen deutlichen Unterschied im Paarvergleich zeigte die TFT Gruppe, bei der es zu einer Verlängerung der Abheilzeiten um mindestens vier Ränge bei allen Tieren kam.

Somit ist im direkten Paarvergleich eine Dosis-Wirkungsbeziehung bei der Therapie mit PAA und TFT anzunehmen, während N5, N6 keine Änderung zeigten. Eine Dosis-Wirkungsbeziehung läßt sich unter der Therapie mit PFA vermuten.
Tab. 33 faßt das Ergebnis schematisch zusammen.

Tab. 33: Paarweiser Vergleich der Substanzgruppen hinsichtlich einer Dosis-Wirkungsbeziehung nach Abheilzeiten

Versuch 1	Dosis/Wirkungsbeziehung	Versuch 2
N5 1 % Tr.	Keine	N5 5 % Tr.
N6 1 % Tr.	Keine	N6 5 % Tr.
PFA 1 % Tr.	Fraglich	PFA 5 % Tr.
PAA 1 % Tr.	Ja	PAA 5 % Tr.
TFT 2 % S.	Ja	TFT 1 % Tr.

3.2.2 Vergleich der einzelnen Substanzgruppen nach Abheilzeiten

Die Therapie mit 5 % PFA Tropfen führte zu einer signifikanten ($2p \leq 0.10$) längeren Abheilzeit gegenüber der Therapie mit den 1 % N5 Tropfen, während die 1 % PFA Tropfen signifikant ($2p \leq 0.05$) längere Abheilzeiten gegenüber beiden N5 Gruppen zeigten.
In beiden PAA Gruppen waren die Abheilzeiten signifikant gegenüber N5 ($2p \leq 0.05$) und N6 ($2p \leq 0.10$) verlängert. Deutlich längere mittlere Abheilzeiten fanden sich zwischen 5 % PFA und 5 % N5 bzw. beiden N6 Gruppen und zwischen 5 % PAA und beiden PFA Gruppen. Wegen der

niedrigen Stichprobenzahl konnte ein signifikanter Unterschied statistisch nicht gesichert werden.

Nur eine geringe Verlängerung der Abheilzeiten waren zwischen 1 % PAA und 5 % PFA sowie zwischen 1 % PFA und beiden N6 Gruppen zu beobachten.

TFT führte als 2 % Salbenapplikation, wie auch als 1 % Tropfenlösung zu einer signifikanten ($2p \leq 0.05$) längeren Abheilung gegenüber allen anderen Substanzgruppen. Einen mit $2p \leq 0.1$ signifikanten Verlängerung der Abheilzeiten zur 2 % Salbentherapie zeigte die 1 % Tropfentherapie im Vergleich der TFT Gruppe.
In Abb. 32 ist das Ergebnis schematisch zusammengefaßt.

Abb. 32:
Tabellarische Zusammenstellung des statistischen Vergleichs der Abheilzeiten aller Substanzgruppen beider Versuche.

	N5 1%								
5% N5	0	N5 5%							
1% N6	0	0	N6 1%						
5% N6	0	0	0	N6 5%					
1%PFA	**	**	+	+	PFA 1%				
5% PFA	*	+	+	+	+	PFA 5%			
1% PAA	**	**	*	*	+	+	PAA 1%		
5% PAA	**	**	*	*	+	+	+	PAA 5%	
2% S. TFT	**	**	**	**	**	**	**	**	TFT 2% S.
1% T.TFT	**	**	**	**	**	**	**	**	*

WILCOXON Test

* $2p \leq 0.10$; + : Symbol für eine längere mittlere Abheilungszeit ohne statistische Sicherung in den Vertrauensgrenzen.

** $2p \leq 0.05$

3.3 Abheilungsverlauf

3.3.1 Paarweiser Vergleich der Flächen und der Regenerationsgeschwindigkeiten

Die prozentualen Flächenwerte und Regenerationsgeschwindigkeiten sind den Tab. 2 bis 27 entnommen.
Die 5 % N5 Gruppe hatte eine im Mittel mit 13 % größere Ausgangsfläche als die 1 % N5 Gruppe. Die V(reg) war in der t(1) und in der t(2)-Phase bei allen vier Tieren im Paarvergleich größer, was zu einer Annäherung der Flächen nach 43 Stunden (4. Befund) führte, wobei jeweils 2 größere Flächen in jeder Gruppe lagen.
Ebenfalls zeigten sich im Mittel mit 16 % der idealen Trepanfläche größere Ausgangsflächen in der 5 % N6 Gruppe. Trotz größerer V(reg) aller vier Tiere in der t(1) und t(2)-Phase sowie für drei Tiere in der t(3)-Phase fand sich im Paarvergleich nach 43 Stunden (4. Befund) in der 5 % N6 Gruppe noch bei drei Tieren noch gering größerer Epitheldefekt.
Die Ausgangsflächen für die 5 % PFA Gruppe waren im Mittel um 2 % der idealen Trepanfläche nur gering größer. Ab der 23 Stunden (2. Befund) hatte die 5 % PFA Gruppe im Paarvergleich bei drei Tieren größere Epitheldefekte und nach 48 Stunden (5. Befund) bei allen vier Tieren bis zum Therapieende. Die korrespondierenden V(reg) sind ebenfalls im direkten Paarvergleich kleiner.
Die Ausgangsflächen der 5 % PAA Gruppe waren im Mittel um 18 % der idealen Trepanfläche größer als in der 1 % PAA Gruppe. Die anfängliche V(reg) war auch hier bei allen Tieren im direkten Paarvergleich größer. Bis zum Therapieabbruch nach 89 Stunden (8. Befund) zeigte sich keine eindeutige Tendenz zwischen den beiden Therapien. Danach kam es bei 3 Tieren in der 5 % PAA Gruppe zu einer Regenerationshemmung bis zur Abheilung.

Die 1 % TFT Gruppe hatte im Mittel um 15 % der idealen Trepanfläche größere Ausgangsflächen. Die anfängliche V(reg) in der t(1)-Phase war bei drei Tieren auch in der 1 % TFT Gruppe größer. Ab der 43 Stunden (4. Befund) führte die 1 % Tropfen-Therapie bei drei Tieren im Paarvergleich bis zum Versuchsabbruch zu einer stärkeren Regenerationshemmung als die 2 % Salben-Therapie, was sich mit geringen Abweichungen auch in den korrespondierenden V(reg) zeigte.

Offensichtlich ist die anfängliche V(reg) weniger von der regenerationshemmenden Wirkung der Substanz, als von der Größe der Ausgangsfläche abhängig, wobei sich der epithelhemmende Effekt je nach Pharmakokinetik und Pharmakodynamik im zeitlichen Versuchsablauf früher oder später einstellt.

Zusammenfassend zeigte sich kein Unterschied zwischen der 1 % und 5 % N5 Therapie.
Eine geringe Beschleunigung der Regeneration schien im Vergleich zwischen der 5 % N6 Gruppe und 1 % N6 Therapie tendentiell nachweisbar.
Die 5 % PFA Therapie führte im direkten Paarvergleich zu der 1 % PFA Therapie zu einer offensichtlichen frühzeitigen stärkeren Regenerationshemmung, so daß eine Dosis-Wirkungsbeziehung anzunehmen ist, die allerdings wegen der niedrigen Stichprobenzahl statistisch nicht sicher bewiesen werden konnte.
Die 5 % PAA Therapie zeigt im Vergleich zu der 1 % PAA Therapie vermutlich wegen der unterschiedlichen Ausgangsflächen erst nach dem Versuchsende eine dosisabhängige Hemmung der Epithelregeneration, was auf eine allerdings späte, vermutlich kumulative oder additive Dosis-Wirkungsbeziehung hinweisen könnte.
Die 1 % TFT Tropfen-Therapie führte etwas später als die 5 % PAA Therapie zu einer stärkeren und längeren Regenerationshemmung im direkten Paarvergleich zu der 2 % Salben-

Therapie, was auf eine toxische, vermutlich kumulative Dosis-Wirkungsbeziehung hinwies, aber statistisch nicht gesichert werden konnte.
Tab. 34 zeigt die schematisch zusammengefaßten Ergebnisse.

Tab. 34: Paarvergleich der epithelialen Läsion nach Beobachtungsrängen aus beiden Versuchen hinsichtlich einer Dosis/Wirkungsbeziehung

Versuch I	Dosis/Wirkungsbeziehung (Beobachtungsrang)	Versuch II
N5 1 % Tr.	keine	N5 5 % Tr.
N6 1 % Tr.	keine	N6 5 % Tr.
PFA 1 % Tr.	2 (n=3) 5 (n=4)	PFA 5 % Tr.
PAA 1 % Tr.	8 (n=3)	PAA 5 % Tr.
TFT 2 % S.	4 (n=3)	TFT 1 % Tr.

(n) = Anzahl der mit größeren Werten differierenden Augen zum jeweiligen Beobachtungsrang

3.3.2 Vergleich der einzelnen Substanzgruppen nach Flächen und Regenerationsgeschwindigkeiten

Die verglichenen Werte sind den Tab. 2 bis 27 entnommen. Die schematische Zusammenfassung der Ergebnisse zeigt die Abb. 33.

Abb. 33:

Tabellarische Zusammenstellung des statistischen Vergleichs der Flächen (F) der cornealen Epithelläsion beider Versuche über die Versuchszeit in Beobachtungsrängen.

F_x / F_y	N5 1%								
N5 5%	0	N5 5%							
N6 1%	0	0	N6 1%						
N6 5%	0	0	0	N6 5%					
PFA 1%	0	0	0	0	PFA 1%				
PFA 5%	5*	5*	$T_{spät}$	$T_{spät}$	$T_{spät}$	PFA 5%			
PAA 1%	6**	6**	$T_{spät}$	$T_{spät}$	7**	0	PAA 1%		
PAA 5%	5*,6* 8-10*	5*,6** 8-10*	8-10*	6* 9-10*	6* 8-10*	10*	9-10*	PAA 5%	
TFT 2%Sa.	5* 8-12**	3**,5* 7-12**	6-12**	3* 6-12**	6-12**	9-12**	7-12**	7-12**	TFT 2%Sa.
TFT 1%	5* 6-12**	3*,5* 6-12**	6-12**	6-12**	8-12**	6-12**	6-12**	7-12**	11*,12*

WILCOXON Test für zwei Stichproben; $T_{spät}$: später Unterschied im Mittelwert der Flächen ohne statistische Sicherung.

Für $F_x > F_y$ / $F_y < F_x$ gilt * $2p \leq 0.10$ ** $2p \leq 0.05$

Ab der 23. Stunde (2. bzw. 3. Befund) hatte die 5% N5 und N6 Gruppe trotz einer größeren mittleren Ausgangsfläche signifikant kleinere epitheliale Läsionen als beide TFT Gruppen.

Nach 48 Stunden (4. Befund) hatte die 1 % N5 Gruppe signifikant kleinere Läsionen gegenüber den beiden TFT Gruppen. Die 1 % N6 Gruppe zeigte das gleiche Ergebnis erst nach 67 Stunden (5. Befund).

Hinsichtlich der epithelialen Läsionen unterschieden sich die Phosphatanaloga N5 und N6 nicht. Jedoch zeigte die 5 % N6 Gruppe bei größeren mittleren Ausgangsläsionen in der t(1) und t(2)-Phase eine signifikant ($2p \leq 0.1$) größere V(reg) als die 1 % N5 und N6 Gruppe. In der t(2)-Phase war die V(reg) in der 5 % N5-Gruppe signifikant größer als in der 1 % N5 und N6 Gruppe, während die 1 % N6 Gruppe eine signifikant größere V(reg) zeigte als die 1 % N5 Gruppe.

Nach 48 Stunden (5. Befund) hatte die 5 % PFA und PAA Gruppe signifikant größere Läsionen gegenüber der 1 % PFA Gruppe.

Nach 64 Stunden (6. Befund) zeigten beide PAA Gruppen signifikant größere Läsionen als beide N5 Gruppen und die 5 % N6 Gruppe, sowie die 5 % PAA und beide TFT Gruppen gegenüber der 1 % PFA Gruppe. Nur die 1 % TFT Gruppe hatte zu diesem Zeitpunkt signifikant größere Flächen gegenüber der 1 % PAA Gruppe.

Nach 75 Stunden (7. Befund) hatte die 1 % PAA und beide TFT Gruppen signifikant größere Läsionen als die 1 % PFA Gruppe. Die beiden TFT Gruppen zeigten ebenfalls signifikant größere Läsionen im Vergleich zu den beiden PAA Gruppen.

Bei Therapieabbruch nach 89 Stunden (8. Befund) hatte die 5 % PAA Gruppe signifikant größere Läsionen als die vier Phosphatanalogagruppen und die 1 % PFA Gruppe, während die beiden TFT Gruppen gegenüber allen anderen Substanzen signifikant größere Läsionen zeigten.

Ein bzw. zwei Tage nach Therapieende hatte die 5 % PFA Gruppe signifikant kleinere Läsionen gegenüber der 5 % PAA und 2 % TFT Salben Gruppe sowie die 1 % PAA Gruppe gegenüber der 5 % PAA Gruppe.

Am 3. Tag nach dem Therapieende hatte die 1 % TFT Gruppe bis zum Versuchsabbruch größere Läsionen als die 2 % TFT Salben Gruppe.

Zusammenfassend fand sich unter den Phosphatanaloga N5 und N6 sowie unter den 1 % PFA Tropfen keine Verlängerung bzw. kein Hinweis auf eine toxische Beeinflussung des epithelialen Regenerationsablaufes.

Zwischen den 5 % PFA Tropfen und beiden N6 Gruppen sowie den 1 % PAA Tropfen und beiden N6 Gruppen und zwischen der 5 % und 1 % PFAGruppe zeigte sich im späten Abheilungsverlauf eine deutliche Verlängerung des Regenerationsablaufes. Obwohl die Ergebnisse wegen der niedrigen Stichprobenzahl nicht signifikant sind, ist doch eine toxische Hemmung der Epithelregeneration als Nebenwirkung dieser Substanzen sehr wahrscheinlich.

Unter 5 % N6 waren in den ersten 24 Stunden eine beschleunigte Abheilung zu beobachten.

Unter 5 % PFA kam es zu einer signifikanten Hemmung der Regeneration nach 48 Stunden gegenüber dem unbeeinflußten Abheilungsverlauf von N5, was einer sicheren toxischen Nebenwirkung auf die Epithelregeneration entspricht.

1 % PAA zeigte nach 64 Stunden bzw. 75 Stunden eine stärkere signifikante regenerationshemmende Wirkung gegenüber den unbeeinflußten Verläufen.

5 % PAA zeigte ab der 48 Stunde eine deutliche signifikante Regenerationshemmung gegenüber den unbeeinflußten Abheilungsverläufen und im späteren Verlauf auch gegenüber den 5 % PFA Tropfen und den 1 % PAA Tropfen. Eine sichere stärkere toxische Nebenwirkung, die vermutlich auch kumulativ bedingt ist, ist hinsichtlich der cornealen epithelialen Regeneration zu erwarten.

Unter den 1 % TFT Tropfen und der 2 % TFT Salbe fand sich eine schwerwiegende Hemmung der epithelialen Regeneration, die schon nach 23 Stunden gegenüber den unbeeinflußten Verläufen nachweisbar war und als eine schwere toxische und kumulativ toxische Nebenwirkung auf die epitheliale Regeneration, die von der Galenik der Substanz abhängt, anzusehen ist.

V. Diskussion

1. Wertigkeit der Methode und Analyse der Regenerationskinetik

Die chemische, mechanische oder kombinierte beidseite partielle superfizielle Keratektomie im Kaninchenmodell ist die experimentelle Referenzmethode in der Beurteilung der Toxizität eines lokal am Auge applizierten Pharmakons im direkten Vergleich zu dem verwendeten Lösungsmittel. Die Beurteilungskriterien sind der zeitliche Regenerationsverlauf, die qualitative Beurteilung des regenerierenden Hornhautepithels und die histologische Untersuchung (Übersicht bei ULLERICH und DURCHSCHLAG, 1953; HEYDENREICH, 1958 und 1962; KÜCHLE, 1955 und 1957; WOLLENSAK und KYPKE, 1965; KILP et al., 1976; HOLTMANN und STEIN, 1977).

In dieser Regenerationsstudie wurden die Nebenwirkungen von 5 Pharmaka auf das regenerierende Hornhautepithel in Abhängigkeit zu der Substanzdosis untersucht. Im ersten Versuch wurde das rechte Tierauge nicht als Koncrollauge mittherapiert, sondern im zweiten Versuch mit der höheren Pharmakakonzentration der gleichen Substanz behandelt. Dieses Vorgehen ist sinnvoll, da der intraindividuelle Vergleich mit einem Korrelationskoeffizienten von r=0.93 zwischen dem linken und rechten Auge eines Tieres wesentlich höher ist als der Korrelationskoeffizient im interindividuellen Vergleich (MOSES et al., 1979) (siehe Abb. 18 u. 19, Seite 86 u. 87).
Die Testsubstanzen N5 und N6 waren im tierexperimentellen Herpesinfektionsmodell weitgehend wirkungslos (GERKE, 1983). Anstelle eines Placebos wurden diese voraussichtlich wirkungslosen Substanzen mituntersucht.
Da Pharmaka allgemein in Salbenemulsionen einen geringeren Wirkungseffekt haben (WOLLENSAK, 1965), war es sinnvoll, die 2 % TFT-Salbe als klinische Referenzsubstanz im ersten

Versuch mit den niedrigeren Konzentrationen der anderen Testpharmaka zu vergleichen.

Die Stichprobengröße von 4 Augen gilt als ausreichend um einen Unterschied in den Abheilzeiten zu erkennen (KÜCHLE, 1957; WOLLENSAK und KYPKE, 1965). Allerdings ist zur statistischen Auswertung, insbesondere für den sehr mächtigen intraindividuellen Dosis/Wirkungsvergleich, eine höhere Stichprobenzahl wünschenswert (Wissenschaftliche Tabellen, GEIGY, 1960). Bei einer photoplanimetrischen Auswertung des Regenerationsablaufes ist eine Stichprobengröße von 8 Tieren wünschenswert, um nach Ausschluß der sogenannten biologischen Ausreißer noch genügend große Vergleichsgruppen zu erhalten (THOMPSEN et al., 1982; FRIEND und TOFT, 1978).

Der Trepan ist 1910 von JUSELIUS als Markierungshilfe in die experimentelle ophthalmologische Forschung eingeführt worden. Der ideale Trepandurchmesser und die damit bewirkte Ausgangsdefektfläche ist, wie auch die Methodik der superfiziellen Abrasio, umstritten (HIRST et al., 1981; THOMPSEN et al., 1982; PFISTER, 1975; OBELS et al., 1982; MOSES et al., 1979; HO et al., 1974).

Nach ULLERICH und DURCHSCHLAG, 1953 sieht man bei 6 mm durchmessenden Defektflächen die geringste Streuung der Abheilzeiten bei genügender Testsensibilität. Übereinstimmend werden in der Literatur die Abheilzeiten in tierexperimentellen Studien für einen 6 mm durchmessenden Epitheldefekt (28.3 mm^2) nach einer mechanischen Abrasio mit 42 $\pm$ 12 Stunden angegeben (ULLERICH und DURCHSCHLAG, 1953; KÜCHLE, 1955; EHRICH und KOHLBECKER, 1971).
Unter Berücksichtigung der Arbeiten von HANNA, 1960 und HARA, 1962 sowie HANNA et al., 1966 sind PAVAN-LANGSTON et al., 1974 der Meinung, daß 5 mm durchmessende epitheliale Wunden, die im Durchschnitt nach 60 Stunden abheilten, im wesentlichen durch die Zellmigration geschlossen wurden.

Die Proliferation der basalen Epithelzellen bzw. eine DNA De-Novo-Synthese trat erst nach dem vollständigen epithelialen Wundschluß oder am 3. bis 6. Tag nach Keratektomie von den Wundrändern ausgehend auf. Bei 10 mm durchmessenden epithelialen Defekten (78.5 mm^2), die eine mittlere Abheilzeit von 85 Stunden nach einer kombinierten Abrasio hatten (HOLTMANN und STEIN, 1977), soll die Proliferation der basalen Epithelzellen in der späten Regenerationsphase einen entscheidenden Anteil am Wundschluß haben (HARA, 1962). Von den Autoren wird deshalb in den tierexperimentellen Regenerationstudien empfohlen, einen 8,5 mm durchmessenden Trepan als Markierungshilfe für die mechanische Abrasio mit der möglichen Defektflächen von 56.7 mm^2 zu nehmen. Unter Placebo war dieser Epitheldefekt nach 96 Stunden geschlossen (PAVAN-LANGSTON et al., 1974).
Die neueren morphologischen Arbeiten über die epitheliale Regeneration (PFISTER, 1975; CINTRON et al., 1979) haben allerdings gezeigt, daß bei größeren epithelialen Wunden der Wundschluß ausschließlich durch eine kontinuierliche Migration einer 2-3 Schicht dicken Epitheldecke, wie in Kapitel I.2, Seite 20, ausführlich dargestellt, zustande kommt.

Die Abheilzeiten für unterschiedliche Ausgangsdefekte variieren sehr (siehe Tab. 35, Seite 140 und 141). Nach der mechanischen Abrasio eines 7 mm durchmessenden Defektes (38.5 mm^2) fand sich eine mittlere Abheilzeit von 47 Stunden (HO et al., 1974). Dagegen fand sich bei einem 6,5 mm durchmessenden Defekt (33.2 mm^2) eine Abheilzeit von 55 Stunden nach mechanischer Abrasio. Die ursprüngliche Corneadicke war nach 72 Stunden wieder hergestellt (UBELS et al., 1972).
Die Abheilzeiten für die Substanzen N5 und N6 zeigten in beiden Versuchen keine Abweichung voneinander. Sie waren statistisch signifikant kürzer im Vergleich zu den übrigen Substanzgruppen mit Ausnahme von 1 % PFA zu 1 % und 5 % N5. Die mittlere Abheilzeit für diese Substanzgruppen

betrug 68 ± 12 Stunden.

Somit ist bei einer 8 mm durchmessenden Defektfläche (50,3 mm^2 nach mechanischer Abrasio unter Placebo eine mittlere Abheilzeit von 68 + 12 Stunden zu erwarten. Unter der Berücksichtigung der diskutierten Ergebnisse scheint es erlaubt, die offensichtlich unbeeinflußten Abheilungsverläufe in beiden N5 und N6 Gruppen jeweils als Placebo-Gruppe des Versuches zusammenzufassen (WOLLENSAK und KYPKE, 1965). Da sich die Defektflächen und Regenerationsgeschwindigkeiten in der 1 % PFA Gruppe nicht signifikant von der 1 % und 5 % N5 Gruppe unterschieden und die Abweichung der mittleren Abheilzeiten relativ klein war, ist es ebenfalls sinnvoll, die Ergebnisse des Abheilungsverlaufes von den 1 % PFA Tropfen mit als Placebo-Gruppe des Versuchs I zusammenzufassen.

Abb. 34 zeigt den Abheilungsverlauf der Defektflächen der Placebo-Gruppe (n=12) aus Versuch I und Abb. 35 den entsprechenden Abheilungsverlauf für die Placebo-Gruppe (n=8) aus Versuch II. Abb. 36 und Abb. 37 geben den Verlauf der entsprechenden Abheilungsgeschwindigkeiten wieder.

In der statistischen Regressionsanalyse der unbeeinflußten Abheilungskinetik zeigt sich ein hoher Korrelationskoeffizient von r=0.97 in beiden Versuchen hinsichtlich einer exponentiellen Regression zum natürlichen Logarithmus.

In der statistischen Regressionsanalyse der Abheilungsgeschwindigkeiten findet sich ein hoher Korrelationskoeffizient von r=0.89 im Versuch I und r=0.95 im Versuch II für eine lineare Regression.

Somit ist der unbeeinflußte Regenerationsablauf durch eine exponentielle Funktion zum natürlichen Logarithmus darstellbar, während die Abheilungsgeschwindigkeit durch eine Gerade zu idealisieren ist.

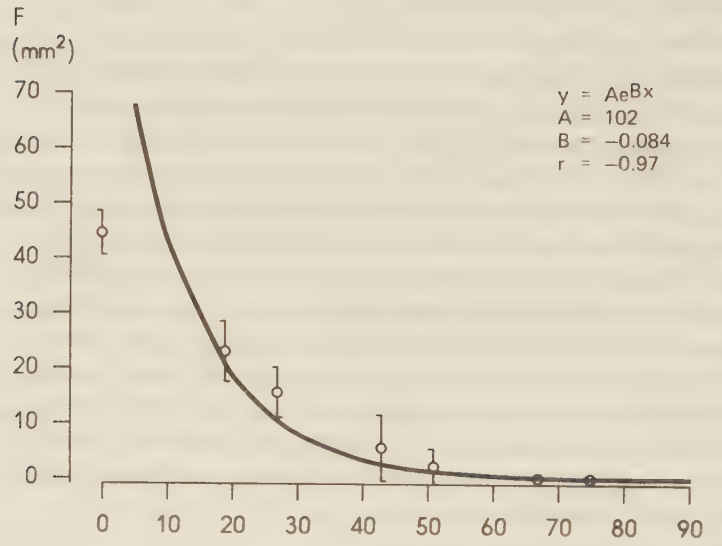


Abb. 34:

Regressionsanalyse des Abheilungsverlaufs hinsichtlich der mittleren Defektflächen unter 1% N5, 1% N6 und 1% PFA (n=12).

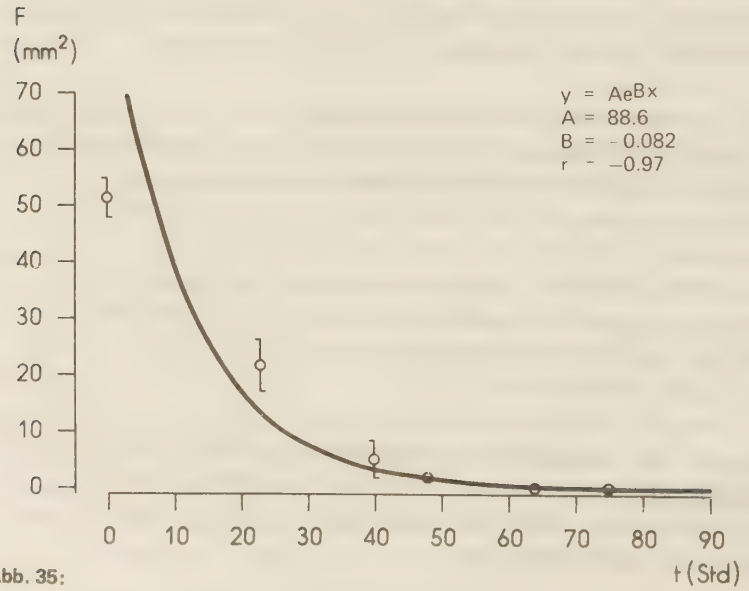


Abb. 35:

Regressionsanalyse des Abheilungsverlaufshinsichtlich der mittleren Defektflächen unter 5% N5 und 5% N6 (n=8).

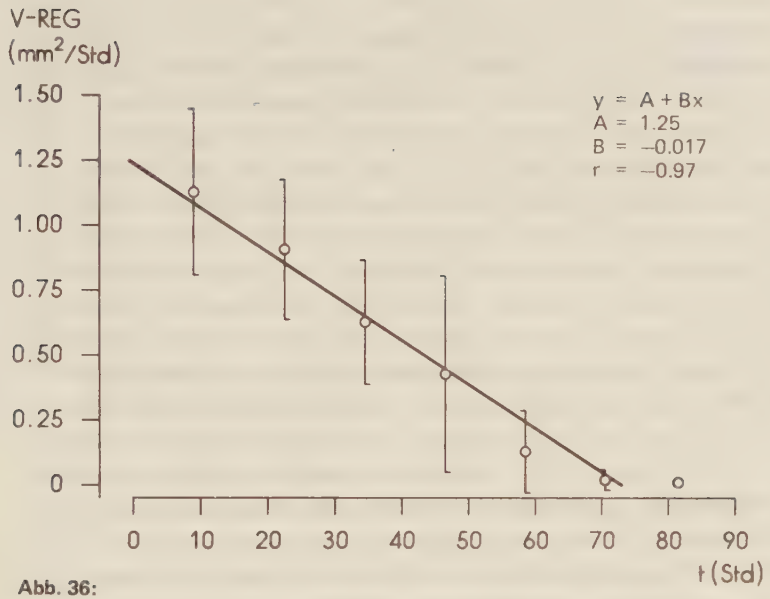


Abb. 36:

Regressionsanalyse der mittleren Abheilungsgeschwindigkeit unter 1% N5, 1% N6 und 1% PFA (n=12).

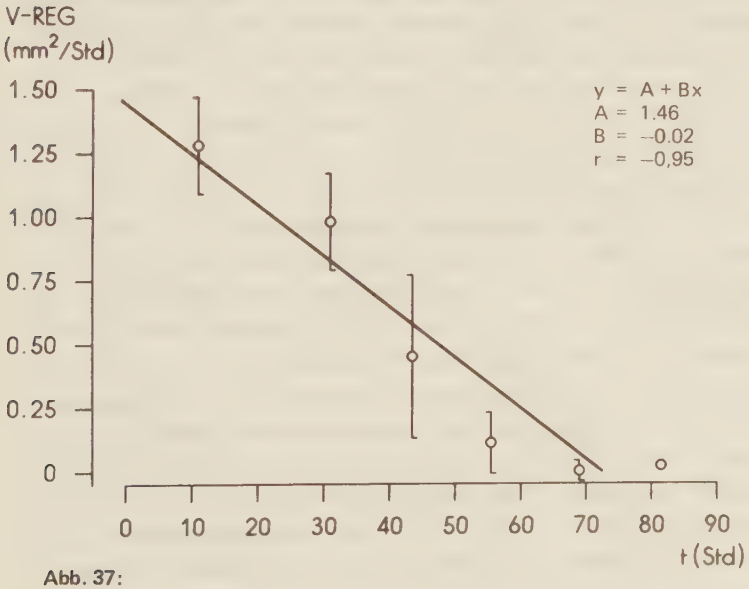


Abb. 37:

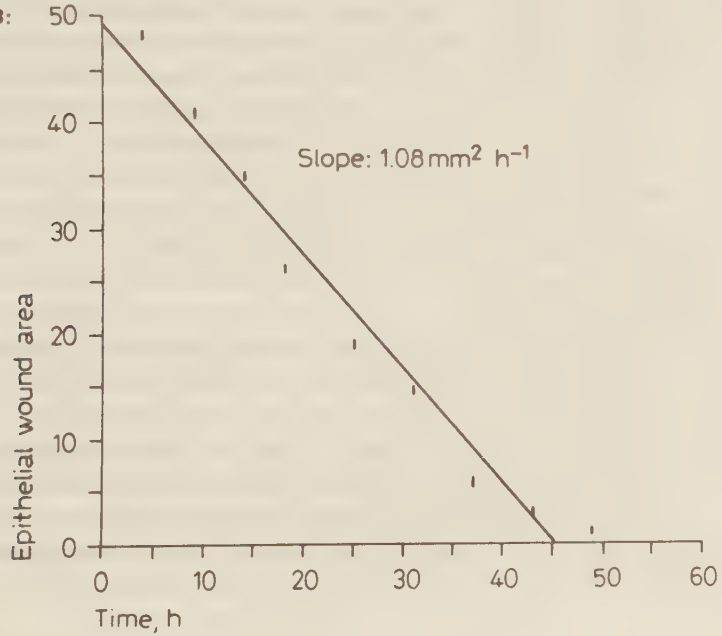
Regressionsanalyse der mittleren Abheilungsgeschwindigkeit unter 5% N5 und 5% N6 (n=8).

Die mittleren Ausgangsdefekte waren im zweiten Versuch durchschnittlich 17 % größer als im ersten Versuch. Die anfängliche korrespondierende Abheilungsgeschwindigkeit war im Mittel mit 1.46 mm^2/Std. deutlich größer als im ersten Versuch, wo sie bei 1.25 mm^2/Std. lag. Im weiteren Verlauf nahm die Regenerationsgeschwindigkeit im zweiten Versuch mit 0.48 mm^2/Tag schneller ab, so daß nach 24 Stunden nur noch kleine Differenzen in den Abheilzeiten zu finden waren.
MOSES et al., 1979 sowie JUMBLATT und NEUFELD, 1981 fanden bei größeren Epitheldefekten eine schnellere Abheilungsrate und vermuteten die Ursache in einem größeren Anteil von migrierenden Zellen bedingt durch größere Wunden. HO et al., 1974 fanden bei nur wenig voneinander abweichenden Defektflächen keinen Unterschied in der Abheilungsgeschwindigkeit. Eine nicht differierende Abheilungsgeschwindigkeit wurde auch von THOMPSEN et al., 1972 bei gering voneinander abweichenden Defektflächen mitgeteilt.

Die Kinetik des Abheilungsvorganges und die Beeinflussung des Regenerationsverlaufes durch unterschiedliche Methoden der epithelialen Keratektomie sind in den letzten 10 Jahren intensiver untersucht worden (HO et al., 1974; MOSES et al., 1979; HIRST et al., 1981; THOMPSEN et al., 1982; UBELS et al., 1982).
Die nach dem klinischen Verlauf erstellte idealisierte Abheilungskurve von ULLERICH und DURCHSCHLAG, 1953 sowie WOLLENSAK und KYPKE, 1974 zeigte einen Paragraphen-ähnlichen Verlauf mit einem flachen Anfangsteil und einem gegensinnig verlaufenden flachen Endteil sowie einem durch eine Gerade zu idealisierenden Mittelteil.
Durch die Möglichkeit der standardisierten Photodokumentation teilweise mit speziellen Filtersystemen (UBELS et al., 1982) wurde die Voraussetzung für eine objektive Auswertung geschaffen. Zur Anwendung kommt die genormte Gewichtsmessung (Gravimetrie) von vergrößerten Defektschablonen (STERN et al., 1983), die planimetrische Aus-

wertung der Defektflächen im Punktzählverfahren (BOWMANN und GREEN, 1982) und die computerassoziierte Photoplanimetrie an Bildschirmeinheiten (THOMPSON et al., 1982). Die mittlere Abweichung für das zuletzt angeführte Verfahren soll bei ± 1 % des Meßwertes liegen (THOMPSON et al., 1982). Für das in dieser Arbeit verwendete computergestützte planimetrische Meßsystem wurde eine Abweichung von max. bis zu ± 6 % laut Vergleich ermittelt.
In mehreren Regenerationsstudien, die das von THOMPSON et al., 1982 inaugurierte Auswertungssystem verwendeten, fand sich in der Regressionsanalyse des unbeeinflußten Abheilungsverlaufs eine hohe Korrelation (s. Abb. 38, unten) bei Anwendung der linearen Regressionsanalyse zur Darstellung des Abheilungsverlaufes der epithelialen Läsion (PETROUTSOS et al., 1982; THOMPSON et al., 1982). In dem von diesen Autoren beschriebenen Auswertungssystem ist der Abheilungsverlauf durch eine Gerade zu idealisieren und die Regenerationsgeschwindigkeit entspricht über den gesamten Abheilungsverlauf einer Konstanten.

Abb. 38:



Die epitheliale Regenerationsgeschwindigkeit wird bei einem 6 bis 6.5 mm durchmessenden Defekt nach der mechanischen Abrasio mit 0.72 bis 0.99 mm2/Std. und bei einem 7 bis 8.8 mm durchmessenden Defekt mit 0.87 bis 0.88 mm2/Std. angegeben (s. Tab. 35, Seite 140/141). Offensichtlich heilen größere Wunden über den gesamten Heilungsverlauf gesehen nicht schneller ab.

Der Variationskoeffizient für die mittlere Abweichung der Regenerationsgeschwindigkeiten ist mit 6 bis 20 % relativ groß. Die Häufigkeit der Photodokumentation scheint einen entscheidenden Einfluß auf die Größe und Abweichung der Regenerationsgeschwindigkeiten zu haben. Bei fortlaufender 4-stündlicher Dokumentation läßt sich eine genügend genaue Korrelation erstellen (THOMPSEN, 1982, PETROUTSOS et al., 1982). Die einmalige tägliche Dokumentation führte zu vergleichsweise sehr niedrigen Abheilungszeiten und einer größeren Streuung (FRIEND und TOFT, 1978).

Bei der kritischen Durchsicht der Arbeiten findet sich eine Ausschlußquote von nahezu 25 % der "sogenannten biologischen Ausreißer", die nicht in der regenerationskinetischen Auswertung berücksichtigt wurden (FRIEND und TOFT, 1978; MOSES et al., 1979). Von manchen Autoren wird lediglich die lineare Abheilungsrate in den ersten 24 bis 48 Stunden (JUMBLATT und NEUFELD, 1981; STERN et al., 1983) oder aus dem mittleren Abheilungsverlauf (von der 24 bis 72 Stunde) ermittelt (JUMBLATT et al., 1979). Von den meisten Autoren wird der späte zeitliche Anteil der Abheilungsphase häufig nicht mehr in der statistischen Auswertung berücksichtigt.

Schließlich ist es fraglich, ob die epitheliale Regeneration, die fast ausschließlich durch die Migration des Epithelverbandes voranschreitet, mit einer konstanten Geschwindigkeit zum Wundschluß führt. Es ist eher plausibel, daß sich der regenerierende Epithelverband mit einer konstant abnehmenden Geschwindigkeit nach den ersten 12 postoperativen Stunden, wie im Kapitel I.2 (Seite 20) ausführlich dargestellt, bis zum Wundschluß vorschiebt.

Der Abheilungsverlauf eines normierten epithelialen Flächendefektes wäre dann durch eine abnehmende Exponentialfunktion zum natürlichen Logarithmus im statistischen Modell zu idealisieren.

Die gefundenen Ergebnisse bestätigen weitgehend diese Theorie (s. Abb. 34 bis 37, Seite 132/133).

Von mehreren Autoren wird der klassischen mechanischen cornealen Epithelabrasio zwei neue chemische Methoden gegenübergestellt (CINTRON et al., 1979, JUMBLATT und NEUFELD, 1981). Die chemische epitheliale Hornhautabrasio mit dem Alkohol n-Heptanol soll den Vorteil haben, daß die Basalmembran weniger als bei der mechanischen Abrasio geschädigt wird. Häufig bleiben Zelltrümmer liegen und es kommt vereinzelt zu kleinen Basalmembrandefekten. Andererseits diffundiert n-Heptanol über den markierten Wundrand hinaus in das angrenzende Epithel und in das obere Stromadrittel, was augenblicklich zu einer Zerstörung der Keratozyten und der wundnahen Epithelzellen führt (CINTRON et al., 1979). Nach der mechanischen Abrasio wurden lediglich Zerreißungen von Stromalamellen und vereinzelt stärker dystrophisch veränderte Keratozyten mit Zellmembranverformung und Auftreten von großen Vesikeln in dem oberflächlichen Stroma gesehen. DOHLMANN et al., 1968 beschreibt Nekrosen von Keratozyten nach der mechanischen Abrasio. In einer direkt vergleichenden Studie fanden JUMBLATT und NEUFELD, 1981 eine Senkung der Regenerationsgeschwindigkeit nach der mechanischen Abrasio, was von UBELS et al., 1982 nicht bestätigt wurde. Bei der pachymetrischen Messung des regenerierenden Hornhautepithels fand sich eine signifikant stärkere Schwellung des Epithels in den ersten Stunden nach der mechanischen Abrasio und eine verlängerte Normalisierung der Epitheldicke. HORST et al., 1981 fanden 3 Tage nach der mechanischen Abrasio Hemidesmosomen im regenerierenden Epithel, während nach der n-Heptanol Abrasio bis zum 7. postoperativen Tag keine

zellulären Intermediärfilamente nachgewiesen werden konnten. Das Epithel war leicht von der Basalmembran abzulösen.

Ein weiteres neues chemischen Verfahren in der experimentellen Ophthalmologie ist die normierte Jod-Verätzung nach MOSES et al., 1979. Es fand sich morphologisch keine Schädigung der Basalmembran und der Keratozyten (THOMPSEN et al., 1982). Obwohl die Ausgangsflächen stärker als bei einer n-Heptanol Abrasio mit ± 4-8 % von der idealen Fläche des Applikationstrepans abwichen, wurden besser reproduzierbare Ergebnisse in der Abheilung gefunden (PRETROUSOS, 1982; THOMPSEN, 1972).
Bei der mechanischen Abrasio scheint die anfängliche Defektgröße mit ± 11 % im interindividuellen Vergleich am stärksten zu variieren (HO et al., 1974).
Im ersten Versuch fand sich eine Abweichung von nur ± 5 % zwischen den einzelnen Substanzgruppen und eine mittlere Abweichung der einzelnen Defektflächen von ca. 14 % von der idealen Trepanfläche. Im zweiten Versuch lag die Abweichung der einzelnen Tiergruppen mit ± 8 % voneinander etwas höher, während die Abweichung der einzelnen Trepanflächen von der idealen Trepanfläche mit ± 3 % sehr niedrig war.

Die Defektflächen werden allgemein als zu groß gemessen, da das markierende Fluoreszein interzellulär diffundiert (HEYDENREICH, 1958). Fluoreszein hat keinen hemmenden Einfluß auf die Regeneration (UBELS et al., 1982). Ein möglicherweise regenerationshemmender Effekt ist durch die einmalige Applikation von 1 Tropfen Novesine denkbar, da alle Lokalanästhetika die Regeneration hemmen (KÜCHELE, 1955). Der systematische Fehler wurde durch die sofortige Spülung nach der Instillation von lokalen Anästhetikum und Fluoreszein möglichst klein gehalten.

Mit dem Polymyxin B wurde ein gering regenerationshemmendes Antibiotikum in der TFT Salbe verwendet. Das in den nächtlich applizierten Salben verwendete Neomycin hat einen stärkeren regenerationshemmenden Effekt (STERN et al., 1983). Dieser systematische Fehler führte zu keiner Verfälschung der Ergebnisse, da alle Tiere mit der Substanz behandelt wurden.

Tab. 35: Synopsis der Methodik in den experimentellen Studien zur epithelialen Hornhautregeneration

Wunddiameter (mm)	Dokumentation	Technik	Abheilungsverlauf	Heilungsrate (mm2/Std.)	Abheilzeit (Std.)	Referenz
5	klinische Zeichnung	mechan.	Paragraphenförmig	-	60	Pavan-Langston, 1974
6	klinische Zeichnung	mechan.	Paragraphenförmig	-	42 ± 12	Ullerich u. Durchschlag, 1953
6	3-4 Photos/Tag Planimetrie (Punktzählung)	mechan.	linear	0.72	-	Bowmann u. Green, 1982
6	Photo, Planimetrie	n-Heptanol	18.-30. Std. linear	0.58	48	Jumblatt et al., 1979
6	Photo, Planimetrie	n-Heptanol	linear	0.58	50	Cintron et al., 1982
6.5	Photo, Planimetrie	mechan.	linear	1.25 - 1.45	55	Ubels et al., 1982
6.5	2 Photos/Tag, Computerplanimetrie	mechan.	linear	0.72 ± 0.026 bis 1.17 ± 0.091	-	Ubels et al., 1983
6.5	4 Photos/Tag, Computerplanimetrie	mechan. n-Heptanol	linear	0.99 ± 0.019 0.94 ± 0.019	55	Ubels et al., 1982
7	Photos, Planimetrie	mechan. n-Heptanol	linear in den ersten 24 Std.	1.1 0.88	41	Jumblatt u. Neufeld, 1981
7.3	Photo, Computerplanimetrie	Jod-Ätzung	linear	1.18 ± 0.07	-	Petroutsos et al., 1982

7.7 ± 0.3	4 Photos/Tag, Computerplanimetrie	Jod-Ätzung	linear	1.16 ± 0.05	50	Thompson et al., 1982
8 ± 0.9	Photo, Planimetrie	mechan.	linear	0.78 ± 0.11	47	Ho et al., 1974
8	Photo, Gravimetrie	95% Äthanol	linear ersten 48 Stunden	0.91 ± 0.09	-	Stern et al., 1983
8	2 Photos/Tag, computergestützte Planimetrie	mechan.	exponentielle Abnahme	lin. Abnahme v. 1.25 um 0.017/Std.	68 ± 12	Nekarda, 1984 (eigene Ergebnisse)
8.5	Klin. Zeichnung	mechan.	exponentielle Abnahme	-	96	Pavan-Langston, 1974
9	1 Photo/Tag	mechan. Jod-Ätzung	linear	0.27 ± 0.02 0.25 ± 0.02	-	Friend u. Toft, 1978
9.5 ± 0.8	2-3 Photo/Tag, Planimetrie	Jod-Ätzung	linear	1.42 ± 0.26	ca. 50	Moses et al., 1979
10	klin. Zeichnung	mechan.	exponentielle Abnahme	-	85	Holtmann u. Stein, 1977
Pat. mit Epitheliopathien verschiedener Größe	1 Photo, Planimetrie	mechan. thermal Säure Lauge	nicht linear	0.87 0.85 0.69 0.58	11 bis 120	Daniel et al., 1979

2. Vergleich der Ergebnisse mit dem Schrifttum

Die Phosphatanaloga N5 und N6 zeigten in den Abheilzeiten, im Abheilungsverlauf und im Dosis/Wirkungsvergleich keine regenerationshemmenden Nebenwirkungen am regenerierenden cornealen Epithel als 1 % oder 5 % Substanzlösungen. N5 führte dosisabhängig zu einer mittelgradigen Konjunktivitis, die als direkte toxische Nebenwirkung der Substanz bei einem unveränderten Abheilungsverlauf anzusehen ist. GERKE, 1983 berichtete dagegen über eine stärkere therapieabhängige Konjunktivitis unter der Therapie von N6. Dieser Befund konnte in den Regenerationsversuchen nicht bestätigt werden.
Einerseits führte die 5 % N6 Therapie in den ersten 24 Stunden zu einer signifikanten Beschleunigung der Regeneration, andererseits kam es in der Anfangsphase unter der 1 % N6 Therapie bei 3 Tieren zu einer schnelleren Defektabnahme in der ersten Dauerapplikationsphase des Medikamentes. Die Abheilzeiten und der späte Abheilungsverlauf waren nicht verkürzt. Da größere Ausgangsflächen keinen Einfluß auf die Regenerationsgeschwindigkeit haben sollen (HO et al., 1974; THOMPSEN et al., 1972), wäre ein regenerationsfördernder Einfluß von N6 anzunehmen. GERKE, 1983 fand unter der 5 % N6 Therapie eine tendentiell bessere Abheilung der Keratitis dendritica herpetica im Kanincheninfektionsmodell. Die von ihm mitgeteilte stärkere vaskuläre Mitreaktion der Konjunktiven ist vermutlich auf eine persistierende herpetische Konjunktivitis zurückzuführen. Weitere experimentelle Versuche an einer größeren Fallzahl zur Klärung der Frage einer möglichen Beschleunigung der epithelialen Regeneration sind notwendig.

1 % PFA führte zu einer signifikanten Verlängerung der Abheilzeiten gegenüber N5 und zu einer tendentiellen Verlängerung der endgültigen Abheilung gegenüber N6.

Dagegen war der Regenerationsablauf unbeeinflußt.
5% PFA führte nur zu einem gesicherten verlängerten Abheilungsverlauf gegenüber 1 % N5 Tropfen, während eine deutliche mittlere Verzögerung im Abheilungsverlauf gegenüber 1 % N6 und 5 % N6 bzw. N5 wegen der niedrigen Stichprobenzahl statistisch nicht gesichert werden konnte. Nach 48 Stunden war der Abheilungsverlauf signifikant unter 5 % PFA nur gegenüber N5 verlängert. Eine tendentielle Verlängerung mit vergrößerten Defektflächen fand sich im späten Abheilungsverlauf gegenüber N6 und 1 % PFA. Eine stärkere Regenerationshemmung war nur tendentiell im Dosiswirkungsvergleich von 5 % PFA zu 1 % PFA nachweisbar.
PFA führte in beiden Versuchen in keinen nennenswerten konjunktivalen Nebenwirkungen.
In der 5 % PFA Gruppe kam es bei 3 Tieren nach dem Epithelschluß der artefiziellen Abrasio zu einer therapieabhängigen erosiven Keratopathie, die 24 Stunden nach Therapieabbruch klinisch nicht mehr nachweisbar war. Die Histologie der Cornea des Tieres mit der längsten Abheilzeit unter 5 % PFA zeigte 11 Tage nach dem Therapieende eine weitgehend abgeschlossene unauffällige epitheliale Regeneration.

Bei einem Molekulargewicht von 125 DALTON wurde mit einem Tropfen PFA (ca. 50 µl) in der 1 % Lösung 4 µmol bzw. in der 5 % Lösung 20 µmol und als Gesamttagesmenge 60 µmol bzw. 300 µmol appliziert.
Die isolierte virusinduzierte DNA-Polymerase war mit 3,5 µmol PFA zu 50 % in vitro hemmbar (RENO et al., 1978). 100 µmol PFA führte zu einer 80 %igen Hemmung der aus infizierten Zellkulturen isolierten virusinduzierten DNA-Polymerase (HELGSTRAND, 1979). Mit 100 bis 150 µmol fand sich eine über 90 %ige Hemmung der HSV-1 und HSV-2 infizierten Zellkulturen. Eine 99,9 %ige Hemmung fand sich bei 500 µmol PFA (HELGSTRAND et al., 1979; CHENG, 1981). Eine 50 %ige Hemmung der zellulären DNA-Polymerase alpha aus Kulturzellen fand sich übereinstimmend in vitro mit 50

bis 55 µmol PFA (HELGSTRAND et al., 1978; SABUORIN et al., 1981; MODAK et al., 1980; ERIKSSON et al., 1982). 500 µmol PFA führte zu einer reversiblen 50 %igen Hemmung des Zellwachstums von mehreren Zellkulturen. Dagegen war die DNA-Synthese und die Zellproliferation erst bei 1 mmol PFA zu 50 % gehemmt, während sich unter 100 µmol PFA keine Proliferationshemmung zeigte (STENBERG und LARSON, 1978).

Es ist aus den oben diskutierten Angaben aus der Literatur zu vermuten, daß die Therapie mit 15 täglichen Applikationen von 1 % PFA Tropfen insbesondere unter der Berücksichtigung des Verdünnungs- und Auswaschungseffekt durch den Tränenfilm nicht die pharmakologisch notwendige Hemmkonzentration für die zelluläre DNA-Polymerase alpha bzw. einer Hemmung der Zellproliferation erreichte.
Der Abheilungsverlauf zeigte sich gegenüber den Phosphatanaloga unbeeinflußt. Es ist weiterhin zu vermuten, daß eine antiherpetische Therapie mit 15 täglichen Tropfen von 1 % PFA im subtherapeutischen Bereich liegt.

Die 5 % PFA Tropfen mit einer täglichen Applikationsmenge von 300 µmol liegen im idealen therapeutischen Bereich für die Therapie der herpetischen Keratitis nach den Ergebnissen von RENO et al., 1978 und HELGSTRAND et al., 1979.
Mit 3 % PFA Tropfen fand sich ein signifikant besserer Abheilungsverlauf als mit 0.1 % IDU bei der Therapie der Keratitis herpetica im Kaninchencheninfektionsmodell (ALENIUS et al., 1980), wie in Kapitel 3.3.3 ausführlich dargestellt.
Die im späten Regenerationsverlauf gesehene Verzögerung der epitheialen Regeneration und die beobachteten erosiven Epitheliopathien unter der 5 % PFA Therapie stimmen mit den tierexperimentellen Befunden von STENVERS und LARSON, 1978 überein. Offensichtlich führte der Verdünnungs- und Auswaschungseffekt des Tränenfilms sowie das späte Auftreten von Mitosen in der Proliferationsphase der cornealen

epithelialen Regeneration erst spät zu klinisch erfaßbaren toxischen Nebenwirkungen. Eine mögliche Kumulation der Substanz in den Keratozyten ist denkbar.

5 % PFA führte somit zu einer Verzögerung am Ende der epithelialen Regeneration und vermutlich zu Einzelzellnekrosen bzw. zu einer Zellzyklusstörung unter dem klinischen Bild einer erosiven Epitheliopathie.

Die Therapie mit 1 % und 5 % PAA führte klinisch zu signifikant verlängerten Abheilzeiten gegenüber den Phosphatanaloga. Eine konjunktivale Nebenwirkung wurde nicht beobachtet. Gegenüber 1 % und 5 % PFA war die mittlere Abheilzeit von 5 % PAA zwar deutlich verlängert, aber bei der niedrigen Stichprobenzahl konnte statistisch keine Signifikanz erreicht werden. Dagegen war der Abheilungsverlauf unter 1 % PAA gegenüber 1 % PFA nach 75 Stunden signifikant mit größeren Defektflächen verlängert. Zwischen 1 % PAA und 5 % PFA gab es keinen Unterschied im Abheilungsverlauf. Gegenüber N6 war der Abheilungsverlauf unter 1 % PAA deutlich tendentiell verlängert.
5 % PAA zeigte schon nach 48 bzw. 64 Stunden einen signifikant verlängerten Abheilungsverlauf im Vergleich zu den unbeeinflußten Abheilungsverläufen der Phosphatanaloga und dem 1 % PFA. 24 Stunden nach dem Therapieende war der Abheilungsverlauf von 5 % PAA signifikant gegenüber 5 % PFA und 1 % PAA verlängert. Es bestand eine Dosis/Wirkungsbeziehung zwischen 5 % und 1 % PAA, die nach 89 Stunden bei 3 Tieren zu einer deutlich verlängerten Abheilung am Therapieende unter den 5 % PAA Tropfen führte. Es kam in beiden Versuchen zu einer jeweils dosisabhängigen mittelgradigen erosiven Epitheliopathie bei allen 4 Tieren, die unter 5 % PAA erst 3 Tage nach dem Therapieende abheilte. In der histologischen Untersuchung der Cornea des Tieres mit dem langsamsten Abheilungsverlauf zeigte sich 11 Tage nach dem Therapieende bei einer anatomisch noch nicht abgeschlossenen Epithelregeneration

Zellnekrosen, eine erhöhte Proliferation und vermutlich auf subzellulärer Ebene strukturelle Störungen im Zytoplasma und Nucleus, die auf eine Störung in der Proteinbiosynthese bzw. der DNA-Synthese hinweisen könnten.
Bei einem Molekulargewicht von 139 DALTON wurden mit einem Tropfen PAA ca. 3.6 µmol Substanz als 1 % Lösung bzw. 18 µmol als 5 % Lösung und als Tagesgesamtmenge ca. 54 µmol bzw. ca. 270 µmol appliziert.

NEWTON, 1979 fand eine 50 % Hemmung der isolierten virusinduzierten DNA-Polymerase in vitro mit 1-2 µmol PAA. In Herpes-infizierten Zellkulturen wurde die Virusreplikation mit 50 bis 200 µmol PAA zu 50 % gehemmt (KERN et al., 1977; OVERBY, 1977). Die isolierte zelluläre DNA-Polymerase alpha aus menschlichen Thymuszellen soll mit 30 µmol PAA zu 50 % hemmbar sein (LAUDEN und BERTINO, 1978; SABOUREN et al., 1978). Die DNA-Polymerase beta und gamma zeigten eine deutlich geringere Sensitivität für PAA. Eine 30 % bzw. 63 % DNA-Synthesehemmung und Proliferationshemmung von menschlichen Lymphozyten fanden BERGER et al., 1979 bei 500 µmol bzw. 5 mmol PAA. HUANG, 1975 und NYORMOI et al., 1976 fanden zytotoxische Veränderungen in Zellkulturen bei einer Konzentration von 200 bis 1000 µmol PAA. NEWTON, 1974 sah unter einer Konzentration von 200 µmol PAA eine völlige Wachstumshemmung von Mäusezellkulturen. Nach einer kurzen Inkubationszeit (bis 24 Stunden) zeigten sich pyknotische Zellkerne und Pseudopodien, die reversibel waren. Später verloren die Zellen ihre Teilungsfähigkeit.
Der toxische Einfluß von PAA scheint auch von der Aufnahme der Substanz und der damit ansteigenden intrazellulären Konzentration abzuhängen (BERGER et al., 1979), wobei eine Hemmung der Adenylcyclase eine zusätzliche Rolle spielen könnte, die in zellfreien Systemen von PAA gehemmt werden soll (NEWTON, 1975).
Während der Abheilung kam es in den Dauerapplikationsphasen bei 3 Tieren zu einer im Ausmaß deutlich dosisab-

hängigen Senkung der V(reg) im Gegensatz zu den therapiefreien Nachtphasen in beiden Versuchen. Dies weist auf eine direkte Hemmung der Zellmigration und des Zellstoffwechsels der Epithelzellen hin. Dies führte dosisabhängig zu einer Verzögerung der Abnahme der epithelialen Läsionen.
Das Auftreten einer erosiven Epitheliopathie wurde ebenfalls von GERSTEIN et al., 1975 unter einer kleineren Gesamttagesdosis von 8 täglichen Applikationen von 5 % PAA im Tierexperiment an gesunden Kaninchenaugen nach 72 Stunden beobachtet. Allerdings war das Epithel 48 Stunden nach dem Therapieabbruch klinisch wieder vollständig intakt. MEYER et al., 1976 fanden bei sechsmaliger Applikation von 5 % PAA über 5 Tage keine Nebenwirkungen oder morphologischen Veränderungen am Hornhautepithel.

Offensichtlich kam es sowohl unter der 1 % als auch 5 % PAA Therapie mit 15 täglichen Applikationen neben der direkten Hemmung der Epithelmigration zu einer Zunahme der intrazellulären PAA-Konzentration. Innerhalb der erst nach dem Epithelschluß im wesentlichen einsetzenden Proliferationsphase (HANA, 1966; HARA, 1962) führte diese Kumulation von PAA zu einer Störung der Zellreplikation, die histologisch 11 Tage nach dem Therapieende bei unvollständig regeneriertem Epithel noch nachweisbar war. Zur weiteren Klärung des molekularen Mechanismus bzw. der morphologisch strukturellen subzellulären Störung wären elektronenmikroskopische Untersuchungen sinnvoll.

Da Zellmitosen im cornealen Epithel mit einer örtlichen Häufung auftreten sollen (HANNA et al., 1962), führte die Hemmung der DNA-Synthese in den proliferierenden Zellen bzw. Zellklonen offensichtlich zum gehäuften Auftreten von Zellnekrosen in der basalen Zellschicht, was vermutlich zu kleinen Defekten im Epithel und zu dem Bild der erosiven Keratopathie geführt hat.

PAA führte somit dosisabhängig zu einer direkten toxischen und im späteren Verlauf kumulativ toxischen Beeinflussung der Epithelregeneration am Kaninchenauge mit morphologisch strukturellen Veränderungen von regenerierenden Epithelzellen. In mehreren tierexperimentellen Studien über den therapeutischen Effekt von PAA bei der Behandlung der Keratitis herpetica dendritica zeigte sich ein signifikant besserer Abheilungsverlauf gegenüber Placebo von 5 % PAA Tropfen und Salbe, während sich der Therapieerfolg von 0.1 % IDU und 5 % PAA nicht voneinander unterschied (GERSTEIN et al., 1975; MEYER et al., 1976 GORDON et al., 1977). 5 % PAA scheint wegen den geringeren Nebenwirkungen eine bessere therapeutische Breite in der Behandlung der Keratitis herpetica dendritica zu haben als 0.1 % IDU.

Unter der Therapie mit 1 % TFT Tropfen und der 2 % TFT Salbe bei einer 15maligen täglichen Applikation kam es zu einer signifikanten deutlichen Verlängerung der Abheilzeit. Klinisch war der Abheilungsverlauf ab der 48. bzw. 51. Stunde in beiden Versuchen verzögert. Dosisabhängig trat eine schwere Konjunktivitis mit Exsudatbildung schon nach 40 Stunden bzw. 67 Stunden auf, die jeweils nach dem Therapieende in Abhängigkeit zu dem vorausgegangenen Schweregrad der konjunktivalen Entzündung abheilte. Schon nach 23 Stunden und deutlich nach 48 bzw. 64 Stunden war der Abheilungsverlauf signifikant unter den 1 % TFT Tropfen und der 2 % TFT Salbe gegenüber den unbeeinflußten Abheilungsverläufen der Phosphatanaloga und dem 1 % PFA verlängert. Nach 64 Stunden kam es unter den 1 % TFT Tropfen früher als unter der 2 % TFT Salbe zu einer signifikanten Verzögerung der epithelialen Regeneration gegenüber dem 5 % PFA und dem 1 % PAA bzw. etwas später nach 75 Stunden auch gegenüber den 5 % PAA.
Ab dem 3. therapiefreien Tag war der Abheilungsverlauf unter der 1 % TFT Therapie signifikant gegenüber der 2 % TFT Salbe verlängert. Im Dosis/Wirkungsvergleich zeigten 3 Tiere schon nach 30 Stunden einen deutlich verlängerten

Abheilungsverlauf unter den 1 % TFT Tropfen. Da in Salbenemulsionen corneal applizierte Pharmaka allgemein eine geringe Bioverfügbarkeit haben sollen (WOLLENSAK, 1965), war dieses Ergebnis zu erwarten. Bei allen Tieren kam es in beiden Versuchen nach dem Epithelschluß zu einer erosiven Epitheliopathie bis zum Versuchsabbruch 11 Tage nach Therapieende. Unter der 2 % TFT Salbe kam es zwischen der 19. und 27. Stunde unter der fortlaufenden stündlichen Therapie zu einem Stillstand der Epithelmigration bei 2 Tieren, während sich eine komplette Regenerationshemmung unter der 1 % TFT Therapie erst nach 40 Stunden einstellte. Während sich die epitheliale Regeneration danach unter der 2 % TFT Salbe deutlich verzögert fortschritt, vergrößerte sich die Defektfläche bei 3 Tieren im 2. Versuch noch bis zur 75. Stunde. Vor dem Therapieende nach 89 Stunden kam es nochmals unter der 2 % TFT Salbe zu einer deutlichen Verzögerung der epithelialen Regeneration, während die Abheilung der mit 1 % TFT behandelten Augen in dieser Phase wieder stark verlangsamt fortschritt. Nach dem Therapieende kam es in beiden Versuchen nur zu einem langsamen Fortschreiten der epithelialen Regeneration.

In der histologischen Untersuchung der mit den 1 % TFT Tropfen therapierten Augen fand sich morphologisch das Bild einer noch nicht abgeschlossenen epithelialen Regeneration. Bei 2 Tieren wiesen eine größere zentrale Erosion mit den strukturellen Hinweisen auf einen erniedrigten regenerativen Zellstoffwechsel auf. Am oberflächlichen Stroma zeigten sich die entzündlichen Komplikationen einer längeren Denudation. Hinweise auf eine direkte zelltoxische Nebenwirkung wie z.B. stärker pyknotische Kerne wurden nicht beobachtet.

Mit einem Tropfen 1 % TFT wurde ca. 1.7 µmol bzw. mit der 2 % TFT Salbe ca. 3.4 µmol Substanz appliziert. Die applizierte Gesamttagesmenge errechnet sich auf ca. 26 µmol bzw. 52 µmol bei einer 15maligen täglichen Applikation und

einem Molekulargewicht des TFT von 296 DALTON.
Eine 50 %ige Hemmung der Virusreplikation wurde übereinstimmend unter 0.6 µmol bis 4.9 µmol TFT in HSV-1 infizierten Zellkulturen gefunden (COLLINS und BAUER, 1977a,b; DE CLERCQ et al., 1978b, 1979 und 1980). Eine 98.5 %ige Hemmung fand sich bei 50 µmol TFT (CIN et al., 1976; PRUSOFF et al., 1977). Eine 50 %ige Hemmung der Zellteilung in Zellkulturen fand sich bei 0.6 µmol bis 50 µmol nach 3tägiger Inkubation mit TFT (PARKHURST et al., 1976; UMEDA und HEIDELBERGER, 1968). DE CLERGQ et al., 1980 sahen morphologische Zellstrukturänderungen an Nierenzellkulturen bei einer Applikationsmenge von 12 µmol TFT nach 3-4 Tagen, während schon 0.03 µmol TFT den Einbau von Desoxyuridin zu 50 % nach 16stündiger Inkubation hemmte. Die therapeutische Breite bzw. chemotherapeutische Spezifität wird mit einem Faktor von 2 bis 2000 unterschiedlich beurteilt (DE CLERGQ et al., 1980 und 1978b; UMEDA und HEIDELBERGER, 1969).

Nach O'BRIEN, 1979 sollen 85 % des applizierten TFT in die regenerierende Corneaepithelzelle diffundieren, wovon ca. nur 60 % als F3TTP phosphoryliert wird und insgesamt nur 3 % in die DNA eingebaut wird. FUJIWARRA et al., 1970 fanden eine 25%igen Einbau von TFT in die DNA von HeLa-Zellkulturen. Die intrazelluläre Konzentration von TFT scheint direkt mit der Konzentration im epicornealen Tränenfilm zu korrelieren, da kein zellulärer Katabolismus oder aktiver Membrantransport gefunden wurde (CLOUGH et al., 1978; O'BRIEN und EDELHAUSER, 1977).
Offensichtlich führte die 15malige tägliche Applikation von 1 % TFT Tropfen stärker als unter 2 % TFT Salbe schon früh nach 40 bzw. 48 Stunden mit ca. 20 Applikationen zu einem Stillstand und damit zu einem "cell-arrest", der dosisabhängig unterschiedlich lange zu beobachten war. Der molekularbiologische Mechanismus ist unklar.
Die Vergrößerung des Epitheldefektes ist einerseits auf

den Spüleffekt der weiteren Applikationen und andererseits auf die fehlende Haftungsfähigkeit der regenerierenden Epithelzunge an der Basalmembran wegen der noch fehlenden Ausbildung von Hemidesmosomen zurückzuführen (KHOUDADOUST et al., 1968). Evtl. könnten auch Zellnekrosen im regenerierenden Epithel für einen Aufbruch der Epitheldecke verantwortlich sein, obwohl eine erosive Keratopathie zu diesem Zeitpunkt im Gegensatz zu der exsudativen Konjunktivitis noch nicht beobachtet wurde.

Die schwere Konjunktivitis ist vermutlich auf eine Hemmung der Regeneration von Endothelzellen bzw. auf einen direkt toxischen Einfluß von TFT auf den Stoffwechsel der Endothelzellen in den Kapillaren zurückzuführen. Nur vereinzelt wurde in klinischen Studie eine stärkere konjunktivale Nebenwirkung beobachtet (LAU et al., 1982). In 4.6 % fand sich in einer größeren klinischen Studie ein subjektives Brennen und Stechen nach Applikation von TFT und in 2.8 % ein Lidödem (BURROUGHS, WELLCOME, 1982).

Die erosive Epitheliopathie wurde erst nach dem Epithelschluß des artefiziellen Epitheldefektes in der Proliferationsphase der epithelialen Regeneration beobachtet, was auf eine kumulativ toxische Wirkung von TFT nach der Induktion von Zellmitosen hinwies, wie schon beim PAA diskutiert. LAU et al., 1982 fand bei einer mittleren Dosis von 5 täglichen Applikationen bei 70 % der mit 1 % TFT Tropfen behandelten Patienten eine erosive Epitheliopathie. Ähnliche Beobachtungen machten COSTA et. al., 1976 und 1979 sowie MC GILL et al., 1974. Dagegen soll nach FALCON et al., 1977 bei einer 9maligen täglichen Applikation von 1 % TFT Tropfen über 3 Wochen eine toxische Nebenwirkung am cornealen Epithel in einer größeren retrospektiven Sammelstatistik nicht häufiger als in 4 % der Patienten zu beobachten sein. Über andere mitgeteilte klinische Nebenwirkungen ist ausführlich in Kapitel 3.1, Seite 37 berichtet worden.

In mehreren größeren tierexperimentellen Studien fand sich keine Regenerationshemmung oder toxische Nebenwirkung einer 2-stündlichen Therapie mit 1 % TFT über 8 Wochen (KAUFMANN, 1965; KAUFMANN und HEIDELBERGER, 1964 und 1965). HOLTMANN und STEIN, 1977 fanden keine Regenerationshemmung nach der mechanischen oder chemischen Epithelabrasio im Kaninchenmodell bei einer 6maligen Applikation von 1 % TFT Tropfen. Ebenfalls fanden LERCHE et al., 1979 keine Hemmung der Stromaregeneration unter 2 % TFT Salbe bei 8maliger täglicher Applikation. Allerdings zeigten sich histologisch in den basalen Epithelzellen stärker pyknotische Kerne bei einem mäßigen Zellödem, was auf eine toxische Zellschädigung hinwies. In den histologischen Untersuchungen von PAVAN-LANGSTON und FOSTER, 1977 wurden über ähnliche toxische Zellschädigungen berichtet. Sie fanden eine zur Kontrolle signifikant erniedrigte stromale Reißfestigkeit nach 8maliger täglicher Applikation von 1 % TFT Tropfen. BREWITT und FEUERHAKE, 1981 sahen eine Regenerationshemmung nach superficialen Keratektomie und 12maliger täglicher Applikation von 1 % TFT Tropfen im Kaninchenmodell. Während unter einer 6maligen täglichen Applikation keine epitheliale Regenerationshemmung beobachtet wurde, fand sich morphologisch eine deutliche Reduktion der Mikrostrukturen der Zelloberfläche, partielle Aufbrüche der Zellmembran und Zellnekrosen in rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen der migrierenden Epithelzellen. Innerhalb von 48 Stunden kam es nicht zu einer Abheilung eines 2,5 mm durchmessenden epithelialen Defektes.

Die klinische Therapie mit 1 % TFT Tropfen bzw. 2 % TFT Salbe ist das allgemein anerkannte therapeutische Regime einer einfachen oder komplikativen viralen cornealen Herpesinfektion, wie es auführlich in Kapitel 3.1.3, Seite 34 dargestellt ist. Die Applikationshäufigkeit wird mit 4x

täglicher Applikation (SUGAR et al., 1980) bis 12maliger 2-stündlicher täglicher Applikation (HYNDIUK et al., 1978) unterschiedlich gehandhabt.

Experimentell führt eine 14-malige kontinuierliche stündliche Applikation während des Tages und eine zusätzliche nächtliche Applikation von 1 % TFT Tropfen bzw. 2 % TFT Salbe in Abhängigkeit von der Bioverfügbarkeit zu einer schweren Hemmung der epithelialen Regeneration mit einem direkt toxisch bedingten Stillstand der epithelialen Migration über mindestens 48 Stunden. Weiterhin kommt es zu dem Bild einer schweren exsudativen Konjunktivitis und zu einem späten kumulativ-toxischen Effekt unter dem Bild einer langanhaltenden erosiven Epitheliopathie.

VI. Zusammenfassung

In zwei vergleichbaren Versuchen wurde die Hemmung der cornealen Epithelregeneration nach partieller mechanischer superfizieller Keratektomie an der Kaninchenhornhaut unter den Virus-DNA-Polymerase Hemmstoffen Phosphonoameisensäure (PFA), Phosphonoessigsäure (PAA) zwei neuen Phosphatanaloga N5 und N6 sowie dem Antimetaboliten 5-Trifluormethyl-2'-desoxyuridin (TFT) als Referenzsubstanz unter einer doppelten klinischen Tagesdosis (14malige Tropfenapplikation tags/ 1malige Salbenapplikation in einer 8-stündigen Nachtphase) mit jeweils 1 % und 5 % Tropfenlösung bzw. 2 % TFT Salbe und 1 % TFT Tropfen untersucht. Klinisch dokumentiert und ausgewertet wurde die konjunktivale Reaktion und die Abheilzeit. Photodokumentiert und und planimetrisch ermittelt wurde die Abnahme der Defektfläche und der Verlauf der Regenerationsgeschwindigkeit.

1. Die Phosphatanaloga N5 und N6 zeigten keine Beeinflussung der epithelialen Regeneration. Eine mittelgradige dosisabhängige Konjunktivitis trat unter der Therapie mit N6 auf.

2. 5% PFA Tropfen führten im Gegensatz zu den 1 % PFA Tropfen zu einer Hemmung der epithelialen Regeneration, die hinsichtlich der Abheilzeit gegenüber den 1 % N5 Tropfen signifikant war. Ein signifikanter Unterschied hinsichtlich des Abheilungsverlaufes bestand nach 50 Stunden gegenüber N5. Nach dem Epithelschluß trat eine kurzzeitige erosive Epitheliopathie auf. Eine Nebenwirkung an den Konjunktiven wurde nicht beobachtet. Histologisch zeigte sich keine nennenswerte Abweichung von einer normalen Epithelregeneration.

3. PAA führte zu einer stärkeren Hemmung der epithelialen Regeneration, die hinsichtlich der Abheilzeiten signifikant gegenüber den Phosphatanaloga verlängert war. Signifikant größere Defektflächen zeigte die 5 % PAA Therapie nach 48 bzw. 64 Stunden gegenüber den Phosphatanaloga und dem 1 % PFA, nach 113 Stunden gegenüber dem 1 % PAA und nach 131 Stunden gegenüber dem 5 % PFA. 1 % PAA zeigte signifikant größere Defekte nach 65 Stunden gegenüber N5 und nach 75 Stunden gegenüber 1 % PFA. Zu 5 % PFA fand sich kein Unterschied. Eine Dosis/Wirkungsbeziehung ist hinsichtlich des Abheilungsverlaufes anzunehmen. Unter 1 % und 5 % PAA wurde eine stärkere nach dem Therapieabbruch länger anhaltende erosive Epitheliopathie beobachtet. Konjunktivale Nebenwirkungen traten nicht auf. Histologisch zeigte sich eine auffallend starke proliferative Tendenz des regenerierenden Epithels mit deutlichen Hinweisen auf eine strukturelle Störung des Zytoplasmas und des Nucleus mit Einzelzellnekrosen in der Basalschicht.

4. TFT führte zu einer starken Hemmung der Epithelregeneration, die hinsichtlich der Abheilzeiten signifikant gegenüber PAA, PFA und den Phosphatanaloga war. Einen signifikant verlangsamten Abheilungsverlauf zeigten die 1 % TFT Tropfen und die 2 % TFT Salbe nach 23 bzw. 64 Stunden gegenüber den Phosphatanaloga und 1 % TFT gegenüber 1 % PAA sowie nach 89 Stunden auch 1 % TFT gegenüber 5 % PFA. Die 2 % TFT Salbe zeigte das gleiche Ergebnis 24 Stunden später. Eine Dosis/Wirkungsbeziehung bestand zwischen der 1 % Tropfen Therapie und 2 % Salben Therapie hinsichtlich der Abheilzeit und nach 161 Stunden hinsichtlich größerer Epitheldefekte. Zwischen der 19. und 27. Stunde kam es unter der fortlaufenden Therapie mit 1 % TFT Tropfen und von der 40. bis zur 75. Stunde unter der Therapie mit den 2 % TFT Salbe zu einem Stillstand der Regeneration mit Vergrößerung der Defektflächen unter den 1 % TFT

Tropfen. Nach 40 Stunden bzw. 67 Stunden kam es dosisabhängig zu einer starken, teils exsudativen Konjunktivitis im Mittel bis zu 4 Tagen nach dem Therapieende. Unter der 1 % TFT Therapie war die artifizielle Erosion bei 2 von 4 Tieren nach 15 Tagen noch nicht abgeheilt. Dosisabhängig kam es zu einer stärkeren erosiven Epitheliopathie, die im Mittel bis zu 10 Tagen nach dem Therapieende nachweisbar war. Histologisch bestätigte sich die stark gehemmte Epithelisation. Das regenerierende Epithel zeigte mittelgradige dystrophe Störungen und im oberflächlichen Stroma fand sich eine stärkere degenerative Schädigung.

5. Die zweimalige tägliche Photodokumentation und die planimetrische Auswertung der epithelialen Läsion mit der Berechnung des Epitheldefektes und der Regenerationsgeschwindigkeit stellt eine objektive und sensible Methode zur Analyse einer möglichen regenerationshemmenden Nebenwirkung von Medikamenten dar. Die klinische Dokumentation mit der Auswertung der Abheilzeit ist weniger aussagekräftig. Die mittlere Abweichung einer ermittelten Fläche in dieser Methode beträgt laut Vergleich $\pm$ 6 %. Die mittlere Abheilzeit eines 50 mm2 großen Epitheldefektes (8mm Trepan) beträgt 68 $\pm$ 12 Stunden. Statistisch signifikante Ergebnisse sind in diesem Modell von regenerationshemmenden Pharmaka frühestens nach 50 Stunden zu erwarten. Der unbeeinflußte Heilungsverlaufes eines Epitheldefektes der Anfangsfläche F(o) wird am besten durch eine Exponentialfunktion $F(t) = F(o)xe^{-ct}$ beschrieben. Die Abheilungsgeschwindigkeit läßt sich durch eine Gerade darstellen.

   Ein sehr empfindlicher Parameter zur Charakterisierung der regenerationshemmenden pharmakologischen Potenz ist möglicherweise der Verlauf der Regenerationsgeschwindigkeit in einer längeren Dauerapplikationsphase in dem verwendeten Modell.

1. Aebersold,P.M. :
Relative mutagenicity of nucleoside virostatic drugs in Chinese hamster ovary cells
Adv. Ophthalmol. 38 : 214-21 (1979)

2. Alenius,S., Dinter,Z.,Oeberg,B. :
Therapeutic effect of trisodium Phosphonoformate on cutaneous herpesvirus infektion in guinea pigs
Antimicrob. Agents Chemother. 14 : 408 (1978)

3. Alenius,S., Laurent,U., Öberg,B.O. :
Effect of trisodium Phosphonoformate and idoxyuridine on experimental herpes simplex keratitis in immunized and non - immunizied rabbits
Acta Ophthalmol. 58 : 167-73 (1980)

4. Allaudeen,H.S., Bertino,J.R. :
Inhibition of activities of DNA Polymarase alpha, beta, gamma and Reverse Transcriptase of L 1210 cells by Phosphonoacetic Acid
Biochim. Biophys. Acta 520 ; 490-7 (1978)

5. Arey,L.B., Covode,W.M. :
The method of repair in epithelial wounds of the cornea
Anat. Rec. 86 : 75-86 (1943)

6. Baringer,J.R. :
Recovery of herpes simplex virus from human sacral ganglions
N. Engl. J. Med. 291 : 828-30 (1974)

7. Baringer,J.R., Swoveland,P., :
Recovery of herpes simplex virus from human trigeminal ganglions
N. Engl. J. Med. 288 : 648-50 (1973)

8. Bastian,F.O., Robson,A.S., Yee,C.L. et al :
Herpesvirus hominis : Isolation from human trigeminal ganglion
Science 178 : 306-7 (1972)

9. Bauer, D.J., Collins, P., Tucker,W.E., Macklin,A.W. :
Treatment of experimental herpes simplex keratitis with acylguanosine
Br. J. Ophthal. 63 : 429-35 (1979)

10. Becker,Y., Asher,Y., Cohen,Y., Weinberg-Zahlering,E., Shlomai,J. :
Phosphonoacetic acid-resistent mutants of herpes simplex virus : effect of Phosphonoacetic acid on virus replication and and in vitro deoxyribonleic acid synthesis in isolated nuclei
Antimicrob. Ag. Chemother. 11 : 919 -22 (1977)

11. Becker,B.A., Bopp,B.A., Brusick,D.J., Lehrer,S.D. :
Non-mutagenicity of Phosphonoacetic acid (disodium salt) in vitro tests and in rodents
Fedn. Proc. 35 : 533 (1976)

12. Berger,N.A. et al. :
Phosphonoacetate inhibition of deoxyribonucleic acid synthesis in intact and permeable eukaryontic cells
Biochem. Pharmacol. 28 : 2497-501 (1979)

13. Bietti,G.B. :
Die Viruskeratiden
In : Erkrankung der Hornhaut
Ber. d. deut. Gesell. f. Ophthalmol. (1971)

14. Blümcke,S., Rode,J., Niedorfer,H.R. :
Formation of the basement membrane during regeneration of the corneal epithelium
Z. Zellforsch. 93 : 84-92 (1953)

15. Boezi,J.A. :
The antiherpes virus action of PAA
Pharmacol. Therapy 4 : 231-43 (1979)

16. Bopp,B.A., Estep,C.B., Anderson,D.J. :
Dispisition of disodium phosphonoacetate-C(14) in rat, rabbit, dog and monkey
Fedn. Proc. 36 : 939 (1977)

17. Bowmann,K.A., Green,K. :
Corneal epithelial healing rates after topical nucleotides
Curr. Eye Res. 1 : 619-22 (1981/82)

18. Bresnick,E., Williams,S.S. :
Effects of 5-trifluoromethyldeoxyuridine on deoxythymidine kinase
Biochem. Pharmacol. 16 : 503-7 (1967)

19. Brewitt,H. :
Sliding of epithelium in experimental corneal wounds.
A scanning electron microscopic study
Acta Ophthalmol. 57 : 945-58 (1970)

20. Brewitt,H., Feuerhake,C. :
The effect of trifluorothymidine on epithelial wound healing in rabbit cornea
In : Herpetic eye disease, ed. Sundmacher, R., J.F. Bergmann Verlag, München, 1980

21. Brown,D.C., Kaufmann,H.E., Wellings,P.C. :
Clinical evaluation of Trifluorthymidin in the treatment of herpes simplex corneal ulcers
Am. J. Ophthalmol. 73 : 922 (1972)

22. Burns,R.P. :
A double-blind study of IDU in human herpes simplex keratitis
Arch. Ophthalmol. 70 : 381 (1963)

23. Buschke,W. :
Experimentelle Studien zur Pathophysiologie des Hornhautepithels : Zellbewegungen in der Wundheilung, Zellteilung, Mitosehemmung und andere Kernphänomene
Ophthalmologica (Basel) 118 : 407 (1949)

24. Buschke,W., Friedenwald, J.S., Fleischmann,W. :
Studies of mitotic activities of corneal epithelium
Methods Bull. J. Hopk. Hosp. 73 : 143 (1943)

25. Carmine,A.A. et al. :
Trifluridine : a review of its antiviral activity and therapeutic use in the topical treatment of viral eye infections
Drugs 23 : 329-53 (1982)

26. Cassiman,J.J., De Clercq,E., Jones,A.S., et al. :
Sister chromatid exchange induced by anti-herpes drugs
Br. Med. Journal 283 : 817-8 (1981)

27. Chanda,P.K., Banerjee,A. :
Inhibition of vesicular stomatitis virus transcriptase in vitro by phosphonoformate and ara - ATP
Virology 107 : 562-6 (1980)

28. Cheng,Y.C., Goz,B.,Neenan,J.P., Ward,D.C., Prusoff,W.H. :
Selective inhibition of herpes simplex virus by 5'-amino-2',5'-dideoxy-5-iodouridine
J. Virology 15 : 1284-5 (1975)

29. Cheng,Y.C., Grill,S., Derse,D., Chen,J.Y., Caradonna,S.J. Connor,K. :
Mode of action of Phophonoformate as an anti - herpes simplex virus agent
Biochim. Biophys. Acta 652 : 90-8 (1981)

30. Cheng,Y.C., Hoffmann,P.J., Ostrander,M., Grill,S., Caradonna,S., Tsou,J., Gallagher,M.R., Flanagan,T.D. :
Properties of herpesvirus-specific Thymidine Kinase, DNA Polymerase and DNAse and their implikation in the development of spezific antiherpes agents
Adv. Ophthalmol. Vol 38 :173-86 (1979)

31. Cintron,C., Hassinger,L., Kublin,C.L., Friend,J. :
A simple method for the removal of rabbit corneal epithelium utilizing n - heptanol
Ophthalmic. Res. 11 : 90 (1979)

32. Cintron,C., Kublin,L., Covington,H. :
Quantitative studies of corneal epithelial wound healing in rabbits
Curr. Eye Res. 1 : 507-16 (1981/82)

33. Clough, D.W., Wigdahl, B.L., Parkhurst, J.R. :
Biological effects of 5-carboxy-2'-deoxyuridine : Hydrolysis product of 5-trifluoromethyl-2'-deoxyuridine
Antimicrob. Agents and Chemother. 14 : 126-31 (1978)

34. Collins,P., Bauer,D.F. :
Relative potencies of anti-herpes compounds
Ann. N. Y. Acad. Sci. 284 : 49-59 (1977a)

35. Collins, P., Bauer, D. :
Comparison of activity of herpes virus inhibitors
J. Antimicrob. Chemother. 3 : 73-81 (1977)

36. Coster,D.J., Jones,B.R., Mc Gill,J. :
Treatment of amoeboid herpetic ulcers with adenine arabinoside or trifluorothymidine
Br. J. Ophthalmol. 63 : 418-21 (1979)

37. Coster,D.J., Mc Kinnon,J.R., Mc Gill,J., Jones,B.R., Fraunfelder,F.T. :
Clinical evaluation of adenine arabinoside and trifluorothymidine in the treatment of corneal ulcers caused by herpes simplex virus
J. Infect. Diseases 113 : A173-7 (1976)

38. Daniele, S., Frati, L., Fiore, C., Santoni, G. :
The effect of the epidermal growth factor (EGF) on the epithelium in humans
Von Graefes Arch. klin. Exp. Ophthalmol. 210 (3) : 159-65 (1979)

39. De Clercq,E., Descamps,J., Huang,G.F., Torrence,P.F. :
5-Nitro-2'-deoxyuridine and 5-nitro-2-deoxyuridine-5'-monophosphat antiviral activity and inhibition of thymidilate synthetase in vivo
Molec. Pharmacol. 14 : 422-30 (1978)

40. De Clercq,E., Descamps,J., Verhelst,G., et al. :
Comparative efficacy of antiherpes drugs against different strains of herpes simplex virus
J. Medic. Chem. 19 : 915-8 (1980)

41. De Clercq,E., Descamps,J., Barr,P.J., et al. :
Comparative studies of potency and selectivity of anti-herpes compounds
In : Antimetabolites in biochemistry, biology and medicine, ed. Skoda and Lange, FEBS Symposion 57 : 275-85 (1979)
(Pergamon Press, Oxford)

42. De Clercq,E., Descamps,J., Torrence,P.F., et al. :
Antiviral activity of novel deoxyuridine derivatives
In : Current Chemotherapy, ed. Siegenthaler and Lüthy , Vol 1, pp 352-4, Am. Soc. Microb., Washington (1978b)

43. Dexter,D.C., Oki,T., Heidelberger,C. :
Fluorinated pyrimidines XLII.
Effect of 5-trifluoromethyl-2'-deoxyuridine on transcription of vaccina viral messenger ribonucleic acid
Mol. Pharma. 9 : 283-96 (1973)

44. Dexter,D.L., Wolberg,W.H., Ausfield,F.J., Helson,L., Heidelberger,C. :
The clinical pharmacology of 5-trifluoromethyl-2'-deoxyuridine
Cancer Res. 32 : 247-53 (1972)

45. Ehrlich, W., Kolbegger, K. :
Einfluß von Kontaktlinsen - Benetzungsflüssigkeiten auf die Hornhautregeneration
Ber. dtsch Ophthal. Ges. 71 : 225-9 (1971)

46. Eriksson,B., Öberg,B.O., Wahren,B.W. :
Pyrophosphate analogues as inhibitors of DNA polymerase of cytomegalovirus, herpes simplex virus and cellular origin
Biochim. Biophys. Acta 696 : 115-23 (1982)

47. Ey,R.C., Hughes,W.F., Holmes,A.W., Deinhardt,F. :
The effect of IDU on experimental and clinical herpes simplex infections
Trans. Am. Ophthalmol. Soc. 61 : 100 (1964)

48. Falcon,M.G., Jones,B.R., Williams,H.P., Coster,D.J. :
Management of herpetic eye disease
Trans. Ophthalmol. Soc. U.K. 97 : 345-9 (1977)

49. Falcon,M.G., Jones,B.R., Williams,H.P., et al. :
Adverse reactions in the eye from topical therapy with idoxyuridin, adenine arabinoside and trifluorothymidine
In: Herpetic Eye Diseases, ed. Sundmacher,R., J.F. Bergmann Verlag, München, 1980 p. 263

50. Fitzwilliam,J.R., Griffith,J.F. :
Experimental encephalitis caused by herpes simplex virus : comparison of treatment with tilorone hydrochloride and Phosphonoacetic acid
J. Infect. Dis. 133 : 221-5 (1976)

51. Flodh,H., Helgstrand,E., Lundstroem,J., Oeberg,B. :
Antiviral, pharmacokinetic and toxic properties of Phosphonoformic acid
18th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, AMS, Abstract 212

52. Fogle,J.A., Yoza,B.K., Neufeld,A.H. :
Diurnal rhythm of mitosis in rabbit corneal epithelium
V. Graefes Arch. klin. exp. Ophthalmol 213 : 143-8 (1980)

53. Foster, C.S., Pavan-Langston, D. :
Corneal wound healing and antviral medikation
Arch. Ophthalmol. 95 : 2062-7 (1977)

54. Friedenwald,J.S., Buschke,W. :
Mitotic and wound healing of the corneal epithelium
Arch. Ophthal. 32 : 410 (1944)

55. Friend,J., Thoft,R.A. :
Functional competence of the regenerating ocular surface epithelium
Invest. Ophthalmol. 17 : 143-9 (1979)

56. Fujikawa,L.S., Foster,C.S., Harrist,T.J., Lanigan,J.M., Colvin,R.B. :
Fibronectin in healing rabbit corneal wounds
Lab. Invest. 45 : 120-9 (1981)

57. Fujiwara,Y., Heidelberger,C. :
Fluorinated pyrimidines XXXVIII.
The incorporation of 5-trifluoro-2'-deoxyuridine into the deoxyribonucleic acid of vaccina virus
Mol. Pharmacol. 6 : 281-91 (1970)

58. Fujiwara,Y., Oki,T., Heidelberger,C. :
Fluorinated pyrimidines, XXXVII.
Effects of 5-trifluoromethyl-2'-deoxyuridine on the synthesis of deoxyribonucleic acid of mammalian cells in culture
Molec. Pharmacol. 6 : 263-80 (1970)

59. Gasset,A.R., Katzin,D. :
Antiviral drugs and corneal wound healing
Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 14 : 628 (1975)

60. Gauri,K.K. :
Anti-herpesvirus polychemotherapy
Adv. Ophthal. Vol 38 :151-63 (1979)

61. Gerke,E. :
Vergleichende Therapieexperimente mit Phosphonoameisensäure, Phosphonoessigsäure, Trifluorthymidin und zwei neuen Phosphatanaloga bei der oberflächlichen und tiefen Herpes simplex Keratitis am Kaninchenmodell
Inaugeraldissertation, Berlin 1983

62. Gerstein,D.D., Dawson,C.R., Oh,J.O. :
Phosphonoacetic acid in the treatment of experimental herpes simplex keratitis
Antimicrob. Ag. Chemother. 7 : 285-8 (1975)

63. Gilbert,P. ,Work,K. :
Trifluorothymidine in the treatment of herpes simplex corneal ulcer
A clinical evaluation
Acta Ophthalmol. 58 : 117-20 (1980)

64. Gilette,T.E., Chandler,J.W., Greiner,J.V. :
Langerhans cells of the ocular surface
Ophthalmology 89 : 700-11 (1982)

65. Goodpasture,E.W. :
Herpetic infektion with special reference to the involvement of the nervous system
Medicine 8 : 233 (1929)

66. Gordon,Y.J., Lahav,M., Photiou,S., Becker,Y. :
Effect of Phosphonoacetic in the treatment of experimental herpes simplex keratitis
Br. J. Ophthalmol. 61 : 506-9 (1977)

67. Gundersen,T. :
Herpes corneae with special reference to its treatment with strong solution of iodine
Arch. Ophthalmol. N. Y. 15 : 225-49 (1936)

68. Hahn,F.E. :
Phosphonoacylcompounds as inhibitor of antiviral nucleic acid polymerase
Naturwissenschaften 66 :202 (1979)

69. Hanna,C. :
Proliferation and migration of epithelial cells during corneal wound repair in rabbit and rat
Am. J. Ophthalmaol. 61 : 55-63 (1963)

70. Hanna, C. :
Proliferation and migration of epithelial cells
Am. J. Ophthalmol. (61) : 55-63 (1966)

71. Hanna,C., Bicknell,D.S., O'Brien,J.E. :
Cell turnover in the adult human eye
Arch. Ophthal. 65 : 695-98 (1961)

72. Hanna,C., O'Brien, J.E. :
Cell produktion and migration in the epithelial layer of the cornea
Arch. Ophthal. 64 : 536 (1960)

73. Hara, J. :
An autoradiographic study of regeneration of the corneal epithelium
Folia Ophth. Jap. 13 : 443-6 (1962)

74. Hay,J., Brown,S.M., Jamieson,A.T., et al. :
The effect of phosphonoacetic acid on herpes viruses
J. Antimicrob. Chemother. 3 : 63-70 (1977)

75. Hay,J., Subak-Sharpe,J.H. :
Mutants of herpes simplex virus types 1 and 2 that are resistant to phosphonoacetic acid induced altered DNA polymerase activities in infected cells
J. gen. Virol. 31 : 145-8 (1976)

76. Heidelberger,C. :
Fluorinated pyrimidines
Prog. Nucleic Acid Res. molec. Biol. 4 : 1-50 (1979)

77. Heidelberger,L., Boohar,J.,Kampschroer,B. :
Fluorinated Pyrimidines XXIV.
In vivo metabolism of 5-trifluoromethyl-2'-uracil-2-C(14) and
5-trifluoromethyl-2'-deoxyuridine-2-C(14)
Cancer Res. 25 :377-81 (1965)

78. Heidelberger,C., King,D.H. :
Trifluorothymidine
Pharma and Therapeutic 6 : 427-42 (1979)

79. Heidelberger, C., Parson, D.G., Remy, D.C. :
Synthesis of 5-trifluoromethyluracil and 5-trifluoromethyl-2'-de-
oxyuridine
J. Amer. chem. Soc. 84 : 3597-8 (1962)

80. Helgstrand,E., Öberg,B., Alenius,S. :
Experimental studies on the antiherpetic agent Phosphonoformic acid
Adv. Ophthalmol. 38 : 267-75 (1979)

81. Helgstrand,E., Öberg,B., Alenius,S. :
Experimental studies on the antiherpetic agent Phosphonoformic
Acid
Adv. Ophthalmol. Vol 38 : 276-80 (1979)

82. Helgstrand,E., Eriksson,B., Johansson,N.G., et al. :
Trisodium Phosphonoformate , a new antiviral compound
Science 201 : 819 (1978)

83. Henninghausen,U., Schmidt-Martens,F.W., Reim,M. :
Metabolitenspiegel und Enzymaktivität des energieliefernden
Stoffwechsel im regenerierenden Corneaepithel
Ber. Ophthal. Ges. 171 : 95-9 (1971)

84. Heydenreich,A. :
Die Hornhautregeneration
Monographie, Halle, VEB Marhold, 1958

85. Heydenreich, A. :
Versuche zur Prüfung der Arztneimittelwirkung auf die Regeneration
des Hornhautparenchyms
Monatsbl. Augenheilk. 141 : 365-72 (1962)

86. Heidenreich,A. :
Mikroskopische und histologische Untersuchungsmethoden des Sehorgans
Monographie, Edition Leipzig, 1968

87. Hirst,L.W., Kenyon,K.R., Fogle,J.A., Hanninen,L., Stark,W.J. :
Comparative studies of corneal surface injury in the monkey and rabbit
Arch. Ophthalmol. 99 : 1066 (1981)

88. Ho,P.C., Davis,W.H., Elliot,J.H.E., Cohen,S. :
Kinetics of corneal epithelial regeneration and epidermal growth factor
Invest. Ophthalmol. 13 : 804-9 (1974)

89. Holtmann, H.W., Stein,H.J. :
Zur Frage der Epithelregenrationshemmung bei Trifluorthymidin-Behandlung (F(3)TdR)
Klin. Mbl. Augenheilk. 171 : 576-9 (1977)

90. Huang,E.-S. :
Human cytomegalovirus III.
Virus-induced DNA polymerase
J. Virol. 16 : 298-310 (1975a)

91. Hubermann,E., Heidelberger,C. :
The mutagenicity to mammalian cells of pyrimidine nucleoside analogs
Mutation Research 14 : 130-2 (1972)

92. Hyndiuk,R.A., Charlin,R.E., Alpren,T.V.P., Schultz,R.O. :
Trifluoridine in resistant human herpetic keratitis
Arch. Ophthalmol. Vol 96 : 1839-41 (1978)

93. Jawetz,E., Schultz,R., Coleman,V., Okumoto, M. :
Studies of herpes simplex XI.
The antivirus dynamics of 5-iodo-2'-deoxyuridine in vivo
J. Immunolog. 95 : 635 (1965)

94. Jones,P.A., Benedict,W.F., Baker,M.S., et al. :
Oncogenic transformation of C3H / 10T 1/2 clone 8 mouse embryo cells by halogenated pyrimidine nucleosides
Cancer Research 36 : 101-7 (1976)

95. Jones,B.R., Coster,D.J., Fison,P.N., Thompsen,G.M., Cobo,L.M. Falcon, M.G. :
Effiacy of acyloguanosine (Wellcome 248 U) against herpes simplex corneal ulcer
Lancet 1 : 243-44 (1979)

96. Jumblatt,M.M., Fogle,J.A., Neufeld,A.H. :
Cholera toxin stimulates adenosine 3' 5'-monophosphat synthesis and epithelial wound closure in the rabbit cornea
Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 19 : 1321-27 (1980)

97. Jumblatt,M.M., Neufeld, A.H. :
Caracterisation of cyclic AMP - mediated wound closure of the rabbit corneal epithelium
Curr. Eye Res. 1 : 189-95 (1981)

98. Juselius, E. :
Experimentelle Untersuchungen über die Regeneration des Epithels der Cornea unter normalen Verhältnissen und unter therapeutischen Massnahmen
V. Graefes Arch. klin. exp. Ophthalmol. 168 : 102-15 (1965)

99. Küchle,H.J. :
Zur Wirkung der Oberflächenanästhetika auf die Regeneration des Hornhautepithels
Klin. Mbl. Augenhk. 126 : 313 (1955)

100. Küchle,H.J. :
Zur Beeinflußbarkeit der Regeneration des Hornhautepithels
In : Keratoplastik - Symposion, ed. Günther, G., VEB C. Marhold-Verlag, Halle (1957)

101. Kaufmann,H.E. :
In vivo studies with antivirial agents
Ann. N.Y. Academy Science 130 : 168-80 (1965)

102. Kaufmann,H.E. :
Therapy and Prophylaxis of herpetic eye disease
Report, University of Freiburg, Germany, 1975

103. Kaufmann, H.E., Brown,D.C., Ellison,E.M. :
Herpes virus in the lacrimal gland, conjunctiva and cornea of man : a chronic infection
Am. J. Ophthalmol. 65 : 32 (1968)

104. Kaufmann,H.E., Heidelberger,C. :
Therapeutic antiviral action of 5-trifluormethyl-2'-deoxyuridine
Science 145 : 858 (1964)

105. Kaufmann,E., Kanai,A., Ellison,F.D. :
Herpetic keratitis : Demonstration of virus in the anterior chamber by fluorescent antibody techniques and electron microscopy
Amer. J. Ophthalmol. 71 : 464 (1971)

106. Kaufmann,H.E., Martola,E., Dohlmann,C.H. :
Use of 5-iodo-2-deoxyuridine (IDU) in treatment of herpes simplex keratitis
Arch. Ophthalmol. 68 : 235 (1962)

107. Kaufmann,H.E., Nesburn,A.B., Maloney,E.D. :
IDU therapy of herpes simplex
Arch. Ophthalmal. 67 : 583 (1962)

108. Kern,E.R., Glasgow,L.A., Overall,J.C., Reno,J.M., Boezi,J.A. :
Treatment of experimental herpesvirus infections with Phosphonoformate and some comparisons with Phosphonoacetate
Antimicrob. Agents Chemother. 14 : 817-23 (1978)

109. Kern,E.R., Richards,J.T., Overall,J.C., Glasgow,L.A. :
Genital herpesvirus hominis infection in mice II.
Treatment with phosphonoacetic acid, adenine arabinoside and adenine arabinoside-5'-monophosphate
J. Infect. Dis. 135 : 557-67 (1977)

110. Khodadoust, A.A., Silverstein, A.S., Kenyon, K.R., Dowling, J.E. :
Adhesion of regenerating corneal epithelium
Am. J. Ophthalmol. Vol 65 : 399-403 (1968)

111. Kilp, H., Walzer, P., Hardke, W. :
Beeinflussung der Epithlialisierungsgeschwindigkeit beim Kaninchen durch IDU und Tromantadin-haltige Augensalben
Klin. Mbl. Augenheilk. 168 : 354-61 (1976)

112. La Lau,C. et al. :
Acyclovir and trifluorothymidine in herpetic keratitis :
a multicenter trial
Br. J. Ophthalmol. 66 : 506-8 (1982)
Am. J. Med. 73 (1A) : 305-6 (1982)

113. Laibson,P.R., Arentsen,J.J., Mazzanti,W.D., Eifermann,R.A. :
Double controlled comparison of IDU and trifluorothymidine in thirty-three patients with superficial herpetic keratitis
Trans. Am. Ophthalmol. Soc. 75 : 316-24 (1977)

114. Laing,R.A., Mc Farland, J. :
Specular microscopy study of the corneal epithelial regeneration
Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 20 : 156 (1981)

115. Lass,J.H., Pavan-Langston,D., Park,N.H. :
Acyclovir and corneal wound healing
Am. J. Ophthalmol. 88 : 102-8 (1979)

116. Lee,L.F., Nazerian,K., Leinbach,S.S., Reno,J.M., Boezi,J.A. :
Effect of phosphonoacetat on Marek's disease virus replication
J. natn. Cancer Inst. 56 : 823-7 (1976)

117. Leinbach,S.S., Reno,J.M., Lee,L.F., Isbell,A.F., Boezi,J.A. :
Mechanism of Phosphonoacetat inhibition of herpesvirus-induced DNA polymerase
Biochemistry 15 : 426-30 (1976)

118. Lennarzt,H. :
Diagnosis of herpes simplex
Adv. Ophthalmol. Vol 38 : 17-23 (1979)

119. Lin,T.-S., Chai,C., Prusoff,W.H. :
Synthesis and biological activities of 5-trifluoromethyl-5'-azido-2',5'-dideoxyuridine and 5-trifluoromethyl-5'-amino-2',5'-dideoxyuridine
J. Medic. Chem. 19 : 915-8 (1976)

120. Mao,J.C-H., Robishaw,E.E., Overby,L.R. :
Inhibition of DNA polymerase from herpes simplex virus-infected Wi-38 cells by Phosphonoacetic acid
J. Virol. 15 : 1281-3 (1975)

121. Margalith,M., Falk,H., Panet,A. :
Differential inhibition of DNA polymerase and RNase activities of the reverse transcriptase by Phosphonoformate
Mol. Cell Biochem. 43 : 97-103 (1982)

122. Mc Gill,J., Fraunfelder,F.T., Jones,B.R. :
Current and proposed management of ocular herpes simplex
Survey Ophthalmol. 20 : 258 (1976)

123. Mc Gill,J., Holt-Wilson,A.D., Mc Kinnon,J.R., et al. :
Some aspects of clinical use of trifluorothymidine in the treatment of herpetic ulceration of the cornea
Trans. Ohthalmol. Soc. U.K. 94 : 342-52 (1974)

124. Mc Gill,J., Williams,H., Mc Kinnon,J., Holt-Wilson,A.D., Jones,B. :
Reassessment of idoxyuridine therapy of herpetic keratitis
Trans. Ophthalmol. Soc. U.K. 94 : 542-52 (1974b)

125. Mc Kinnon,J.R., Mc Gill,J., Jones,B.R. :
A coded clinical evaluation of adenine arabinoside and trifluorothymidine in the treatment of ulcerative herpetic keratitis
In : An Antiviral Agent, eds. Pavan-Langston,D., Buchanan,R.A.H., Alford,C.A., New York, Raven Press, 1975, pp 401-10

126. Meyer,R.F., Varnell,E.D., Kaufmann,H.E. :
Phosphonoacetic acid in the treatment of experimental ocular herpes simplex infections
Antimicrob. Ag. Chemother. 9 : 308-11 (1976)

127. Mintsioulis,G., Chandler,R.D., Jang,O. Briones,O. :
Herpetic eye disease in rabbits after Inoculation of autonomic ganglia
Arch. Ophthalmol. Vol 97 : 1515-17 (1979)

128. Modak,M.J., Srivastava,A., Gillerman,E. :
Observations on the Phosphonoformic acid inhibition of RNA dependent DNA polymerase
Biochem. Biophys. Res. 96 : 931-8 (1980)

129. Moses,R.A., Parkinson,G., Schuchardt,R. :
A standard large wound of the corneal epithelium in the rabbit
Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 18 : 103-6 (1979)

130. Nahmias,A., Visintine,A. Haney,M., Stanwick,T., Lee,F., Cavanagh,D. :
Isolation, quantitation and electron mikroscopic detection of virus from tears in human
Adv. Ophthalmol. Vol 38 : 30-7 (1979)

131. Nasemann,T. :
Infektion of skin and its relationship to the Eye
Adv. Ophthalmol. Vol 38 : 24-9 (1979)

132. Nestler, H.J., Garrett, E.R. :
Prediction of stability in pharmalogical preparations
XV. Kinetics of hydrolysis of 5-trifluoromethyl-2'-deoxyuridin
J. pharm. Sci. 57 : 1117 (1968)

133. Newton,A.A. :
Inhibition of the replication of herpes virus by Phosphonoacetat
Adv. Ophthalmol. 38 : 267-75 (1979)

134. Nylen,P. :
Beitrag zur Kenntnis der organischen Phosphoverbindungen
Chem. Berichte 57 B : 1023-35 (1924)

135. O'Brien, W.J. :
Measurement of cornea DNA content
Invest. Ophthalmol. Visual Sci. Vol 18 (5) : 538-42 (1979)

136. O' Brien,W.J. :
The metabolism of trifluorothymidine by cells of the rabbit cornea
Exp. Eye Res. 29 : 619-24 (179)

137. O' Brien,W.J. et al. :
Effects of nucleoside antivirals and their metabolites on the corneal endothelium
Curr. Eye Res. 1 : 243-8 (1981)

138. O' Brien,W.J., Edelhauser,H.F. :
The corneal penetration of trifluorothymidine, adenine arabinoside and idoxiuridine
Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 16 : 1093-1103 (1977)

139. Oki,T., Heidelberger,C. :
Fluorinated pyrimidines XXXIX.
Effects of 5-trifluoromethyl-2'-deoxyuridine on the replication of vaccina viral messenger ribonucleic acid and proteins
Mol. Pharma. 7 : 653-62 (1971)

140. Overby,L.R., Duff,R.G., Mao,J.C-H. :
Antiviral potential of Phosphonoacetic acid
Ann. N. Y. Acad. Sci. 284 : 310-20 (1977)

141. Overby,L.R., Robishaw,E.E., Schleicher,J.B., et al. :
Inhibition of herpes simplex virus replication by phosphonoacetic acid
Antimicrob. Ag. Chemother. 6 : 360-5 (1974)

142. Parkhurst,J.R., Danenberg,P.V., Heidelberger,C. :
Growth inhition of cells in culture and of vaccinia virus infected HeLa cells by derivatives of trifluorothymidine
Chemotherapy 22 : 221-31 (1976)

143. Pavan-Langston, D. :
Current trends in therapy of ocular herpes simplex : Experimental and clinical studies
Adv. Ophthal. Vol 38 : 82-8 (1979)

144. Pavan-Langston,D., Buchanan,R.A., Alford,C.A. :
Adenine arabinoside : an antiviral agent
Raven, New York, 1975

145. Pavan-Langston,D., Dohlmann,C. :
A double - blind clinical study of adenine arabinoside therapy of viral keratokonjunctivitis
Am. J. Ophthalmol. 74 : 81-8 (1972)

146. Pavan-Langston, D., Foster, C.S. :
Triflourthymidine and idoxuridine therapy of ocular herpes
Am. J. Ophthal. 84 : 818-25 (1977)

147. Pavan-Langston,D., Lass,J., Campbell,R. :
Antiviral drops.
Comparative therapy of experimental herpes simplex keratouveitis
Arch. Ophthalmol. 97 : 1132-5 (1979)

148. Pavan-Langston,D., Nelson,D.J. :
Intraocular Penetration ot Trifluridine
Am. J. Ophthalmol. 87 : 814-18 (1979)

149. Pavan-Langston,D., North,R., Geary,P. :
ARA-AMP - a highly soluble new antiviral drug
Ann. Ophthalmol. 8 : 571-9 (1976)

150. Payrau,P., Dohlmann,C.H. :
IDU in corneal wound healing
Amer. J. Ophthalmol. 57 : 999 (1964)

151. Peters, H. :
Die Regeneration des Epithels der Cornea
In : Juselius, E. (1910) : Experimentelle Untersuchungen über die Regeneration des Epithels der Cornea unter normalen Verhältnissen und unter therapeutischen Maßnahmen.
V. Graefes Arch. Ophthal. 75 : 350-400 (1910)

152. Petroutsos, G., Guimaraes, R., Giraud, J.P., Renard, G., Pouliquen, Y. :
Effect of aceteylcysteine (Mucomyst) on epithelial wound healing
Ophthalmic. Res. 14 (4) : 241-8 (1982)

153. Pfister,R.R. :
The healing of corneal epithelial abrasions in the rabbit : a scanning electron microscopic study
Invest. Ophthalmol. 14 : 648-61 (1979)

154. Poirier,R.H., Kingham,J.D., De Miranda,P., Annel,M. :
Intraocular antiviral penetration
Arch. Ophthalmol. Vol 100 : 1964-7 (1982)

155. Prusoff,W.H., Ward,D.C., Lin,T.S. et al. :
Recent studies on the antivirial and biochemical properties of 5-halo-5'-amino-deoxyribonucleosides
Ann. N.Y. Acad. Sci. 284 : 335-41 (1977)

156. Reno,J.M., Lee,L.F., Boezi,J.A. :
Inhibition of herpesvirus replication and herpesvirus-induced DNA polymerase by Phosphonoformate
Antimicrob. Ag. Chemother. 13 : 188-92 (1978)

157. Reye,P., Heidelberger,C. :
Fluorinated pyrimidines XXVI.
Mammalian thymidilate synthetase : Its mechanism of action and inhibition by fluorinated nucleotides
Pharmacology 1 : 14-30 (1965)

158. Rohen, J.W. :
Das Auge und seine Hilfsorgane.
In : Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen.
Ed. Bargmann, W., Bd. III, Teil 4, Springer, 1964

159. Söltz-Szöts,J. :
Zur Serologie des Herpes simplex
Arch. klin. exp. Derm. 209 : 121 (1959)

160. Sabourin,C.L.K., Reno,J.M., Boezi,J.A. :
Inhibition of eucaryotic DNA polymerase by Phosphonoacetate and Phosphonoformate
Arch. Biochem. Biophys. 187 : 96-101 (1978)

161. Salzer,F. :
Über die Regeneration der Kaninchenhornhaut I und II
Arch. Augenheilk. 69 : 272-318 (1911)
70 : 166-184 (1912)

162. Schaeffer,H.J. :
Acyclovir chemestry and spectrum of activity
Am. J. Med. 73 (1A) : 4-6 (1982)

163. Schwarz,W. :
Cornea
Ber. Ophthal. Ges. 71 : 12-7 (1971)

164. Schipkowitz,N.L., Bower,R.R., Appell,R.N. et al. :
Suppression of herpes simplex virus infection by Phosphonoacetic acid
Appl. Microbiol. 26 : 264-7 (1973)

165. Smelser,G., Ozanics,V. :
Effect of chemotherapeutic agents on cell division and healing of corneal burns and abrasions in the rat
Am. J. Ophthalmol. 27 : 1063 (1944)

166. Srinivasan,B.D., Eakins,K.E. :
The reepithelializiation of rabbit cornea following single and multiple denudation
Exp. Eye Res. 29 : 595-600 (1979)

167. Stenberg,K., Larsson,A. :
Reversible effects on cellular metabolism and proliferation by trisodium Phosphonoformate
Antmicrob. Agents Chemother. 14 : 727-30 (1978)

168. Stern,G.A., Schemmer,G.B., Farber,R.D., Grovoy,M.S. :
Effect of topical antibiotic solutions on corneal epithelial wound healing
Arch. Ophthalmol. 101 (4) : 644-7 (1983)

169. Cook,J.G., Cook,M.L. :
Latent herpes simplex virus in spinal ganglia of mice
Science 173 : 843-5 (1971)

170. Streissle,G. :
Persönliche Mitteilung
BAYER AG (1980)

171. Streissle,G. :
Comparative evaluation of antiherpetic drugs in animal experiments
Adv. Ophthalmol. Vol 38 : 43-8 (1979)

172. Suger,J., Stark,W., Binder,P.S., et al. :
Trifluorothymidine treatment of herpes simplex epithelial keratitis and comparison with idoxuridine
Ann. Ophthalmol. 12 : 611-5 (1980)

173. Sugar,J., Varnell,E., Centifanto, Y., Kaufmann, H.E. :
Trifluorothymidine treatment of herpetic iritis in rabits and ocular penetration
Invest. Ophthalmol. 12 : 532-4 (1973)

174. Sundmacher,R. :
Herpestherapie und Prophylaxe
Klin. Mbl. Augenheilk 169 : 308-25 (1976)

175. Sundmacher,R. :
Die Pathophysiologie der Herpes simplex Rezidive
Klin. Mbl.Augenheilk. 170 : 613-21 (1977)

176. Sundmacher,R. :
Trifluorthymidinprophylaxe bei der Steroidtherapie herpetischer Keratouveitiden
Klin. Mbl. Augenhk. 173 : 516-9 (1978)

177. Sundmacher,R. :
Therapy and prophylaxis of dendritic keratitis with topical human interferone
In : Herpetic Eye Disease, ed. R.Sundmacher
Bergmann, Munich, 1981 p. 401-7

178. Sundquist,B., Öberg,B. :
Phosphonoformate inhibits reverse transcriptase
J. Gen. Virol. 45 : 273-81 (1979)

179. Teng,C.C.
The fine structure of the corneal epithelium and basement membrane of the rabbit
Am. J. Ophthalmol. 51 : 278-97 (1961)

180. Teng,C.C. :
Fine structure of the human cornea, epithelium and stroma
Am. J. Ophthalmol. 54 : 969-1002 (1962)

181. Thompson, P., Desbordes, P.M., Giraud, J., Puoliquen, Y. Barritault, D., Cuortois, Y. :
The effect of an eye derived growth factor (EDGF) on corneal epithelial regeneration
Exp. Eye Res. 34 (2): 191-9 (1982)

182. Tone,H., Heidelberger,C. :
Fluorinated pyrimidines XLIV.
Interaction of 5-trifluoromethyl-2'-deoxyuridine 5'-triphosphate with deoxyribonucleic acid polymerase
Pharmacology 9 : 783-91 (1973)

183. Travers,J.P., Patterson,A. :
A controlled trial of adenine arabinoside and trifluorothymidine in herpetic keratitis
J. Int. Med. Res. 6 :102-4 (1978)

184. Ubels,J.L., Edelhauser,H.F., Austin,K.H. :
A comparison of healing of corneal epithelial wounds stained with fluoreszin or Richardson's stain
Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 23 : 127-31 (1982)

185. Ubels, J.L., Edelhauser, H.F., Austin, K.H. :
Healing of experimental corneal wounds treated with topically applied retinoids
Am. J. Ophthalmol. 95 (3) : 353-8 (1983)

186. Ullerich,K., Durchschlag,G. :
Experimentelle Untersuchungen über den Einfluß von Medikamenten auf die Epithelregeneration der Hornhaut
Klin. Mbl. Augenhk. 122 : 707 (1953)

187. Umeda,M., Heidelberger,C. :
Comparative studies of fluorinated pyrimidines with various cell lines
Cancer Research 28 : 2529-38 (1968)

188. Umeda,M., Heidelberger,C. :
Fluorinated pyrimidines XXXI.
Mechanisms of inhibition of vaccina virus replication in HeLa cells by pyrimidine nucleosides
Proc. Soc. Exper. Bio. Med. 130 : 24-9 (1969)

189. Van Bijsterveld,O.P., Post,H. :
Trifluorothymidine versus adenine arabinoside in the treatment of herpes simplex keratitis
Br. J. Ophthalmol. 64 (1) : 33-6 (1980)

190. Warren,R.G., Brown,S.M., Wroblewska,Z. et al. :
Isolation of latent herpes simplex virus from the superior cervical and vagus ganglions of human being
N. Engl. J. Med. 298 : 1068-9 (1978)

191. Wellings,P.C., Awdry,P.N., Bors,F.H., et al. :
Clinical evaluation of trifluorothymidine in the treatment of herpes simplex corneal corneal
Am. J. Ophthalmol. 73 : 932-42 (1972)

192. Whitley,R., Alford,C. Buchanan,R. :
Vidarabine: a preliminary review of its pharmacological properties and therapeutics use
Drugs 20 :267-82 (1980)

193. Wigdahl,B.L., Parkhurst,J.R. :
HEp-2 cell- and herpes simplex virus type 1-induced deoxythymidine kinases : Inhibition by derivatives of 5-trifluoromethyl-2'deoxy-uridine
Antimicrob. Agents Chemother. 14 : 470-5 (1978)

194. Winstanley,E.W. :
Changes in the width of epithelial cells in the healing excised cutaneous wound
Res. Vet. Sci. 20 : 306-10 (1976)

195. Wollensak,J. :
Neuere Gesichtspunkte zur Therapie des Herpes corneae
Klin. Mbl. Augenheilk. 138 : 588 (1961)

196. Wollensak, J. :
Ergebnisse und Ansichten der Virusforschung für die augenärztliche Therapie
Doc. Ophthalmol. 21 : 408 (1966)

197. Wollensak,J. :
Herpes simplex of the eye and possibilities of its therapeutic control
Adv. Ophthalmol. Vol 38 : 99-104 (1979)

198. Wollensak,J. Kypke,W. :
Hemmung der Epithelregeneration und cornealen Wundheilung beim Kaninchen durch Antimetaboliten
V. Graefes Arch. klin. exp. Ophthalmol. 168 : 102-15 (1965)

199. Zirm,M. :
Immunotherapy in corneal herpes
V. Graefes Arch. klin. exp. Ophthalmol. 214 : 253-61 (1980)

Anhang I

Histologische Abbildungen

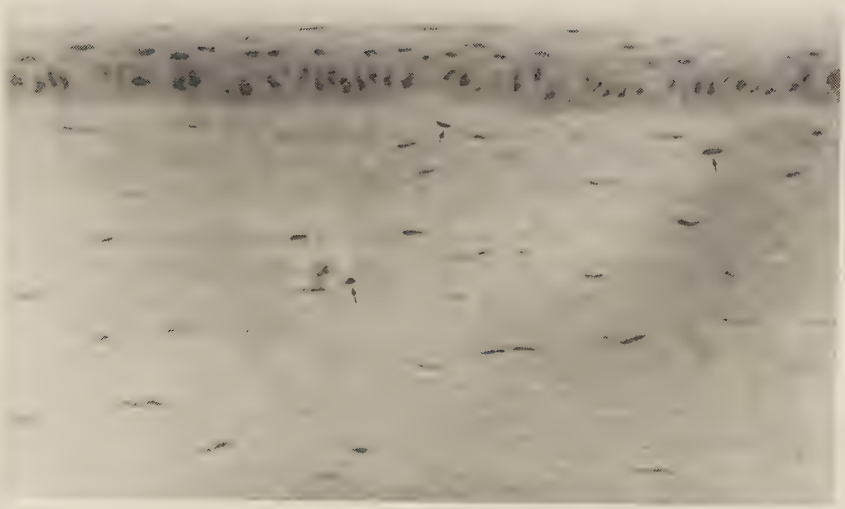
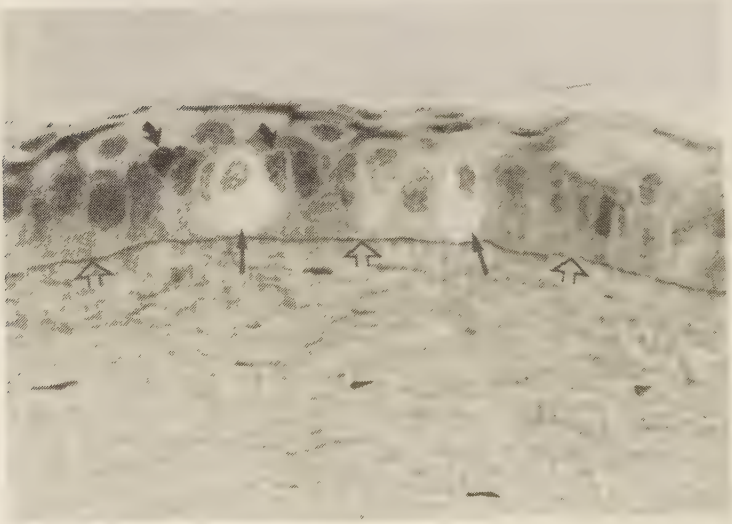


Abb. 1: Tier a, re. Cornea, PAS, 450x
(5% PFA 4 1/2 Tage, 11 Tage nach Therapieende)
† aktivierte Fibroblasten

Abb. 2 u. 3: Tier C, re. Cornea, PAS, 180x bzw. 560x
(5 % PAA Tropfen 4 1/2 Tage, 11 Tage nach Therapieende)
↑ Zellnekrosen, ↗ Mitose, ⇧ Interzellularsubstanz



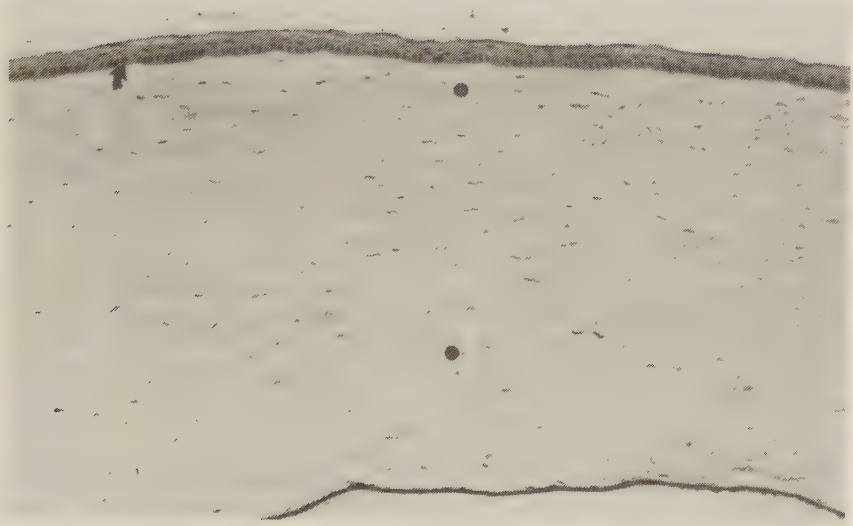
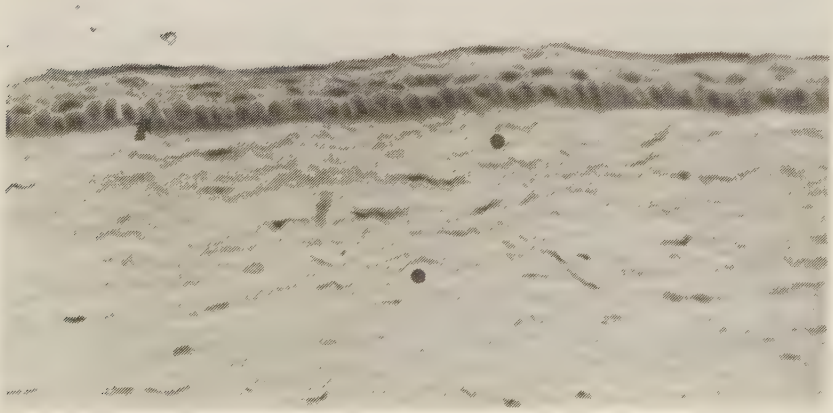


Abb. 4. u. 5: Tier I, re. Cornea, PAS 180x bzw. 480x
(1 % TFT Tropfen 4 1/2 Tage, 11 Tage nach Therapieende)
● Ödem, ↗ Mitose



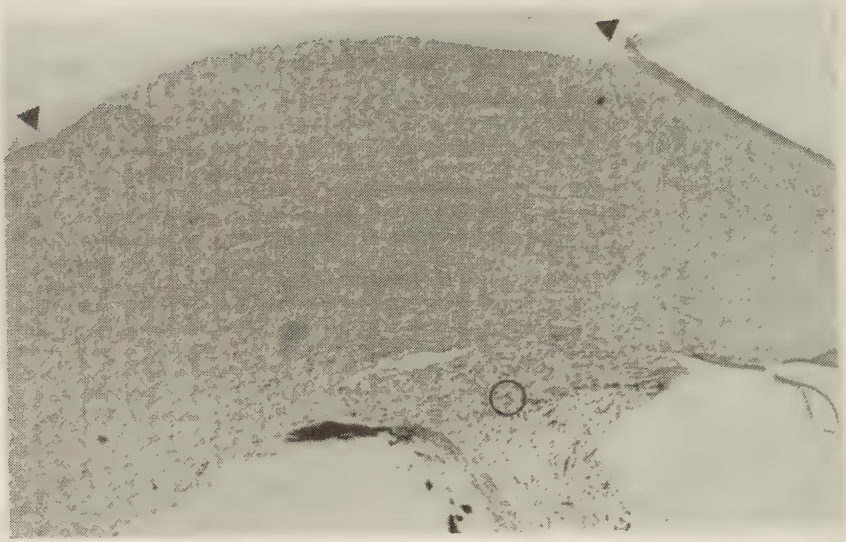


Abb. 6 u. 7: Tier II, re. Cornea, PAS, 72x bzw. 480x
(1 % TFT Tropfen 4 1/2 Tage, 11 Tage nach Therapieende)
▲ Defekt, ↑ Zellnekrose, ↑ aktivierter Fibroblast,
○ Synechie, ↑↑ Makrophage

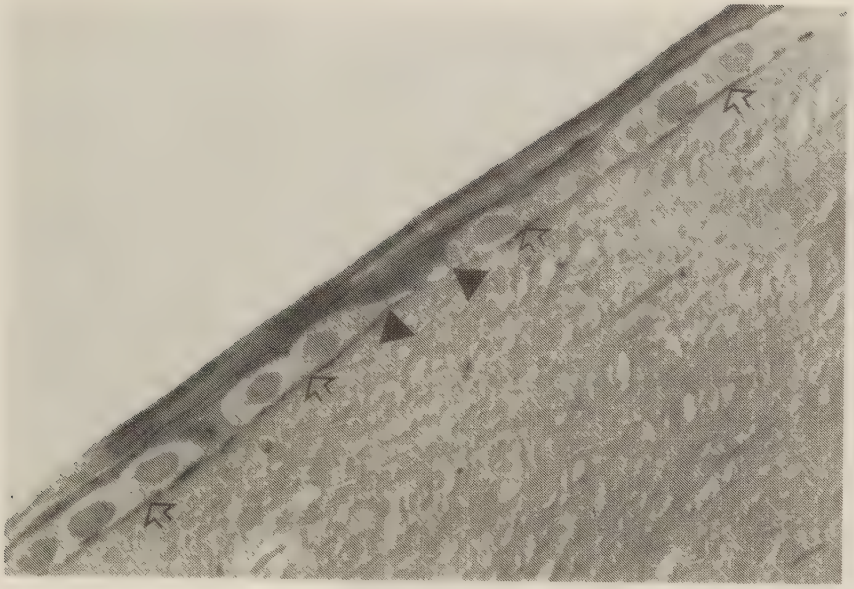


Abb. 8 u. 9: Tier II, re. Cornea, PAS, 560x bzw. 480x
(1 % TFT Tropfen 4 1/2 Tage, 11 Tage nach Therapieende)
⇧ Interzellularsubstanz, ▲ Defekt, ● Ödem,
↑ Zellnekrose

Abb. 9

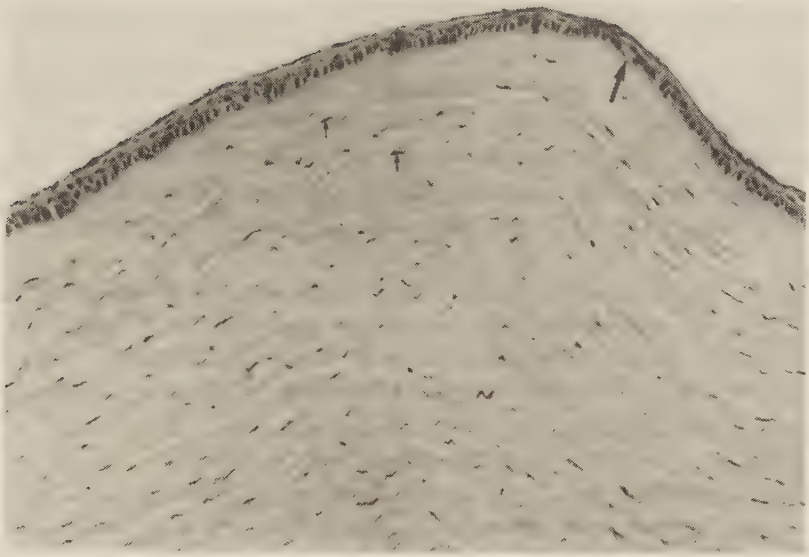
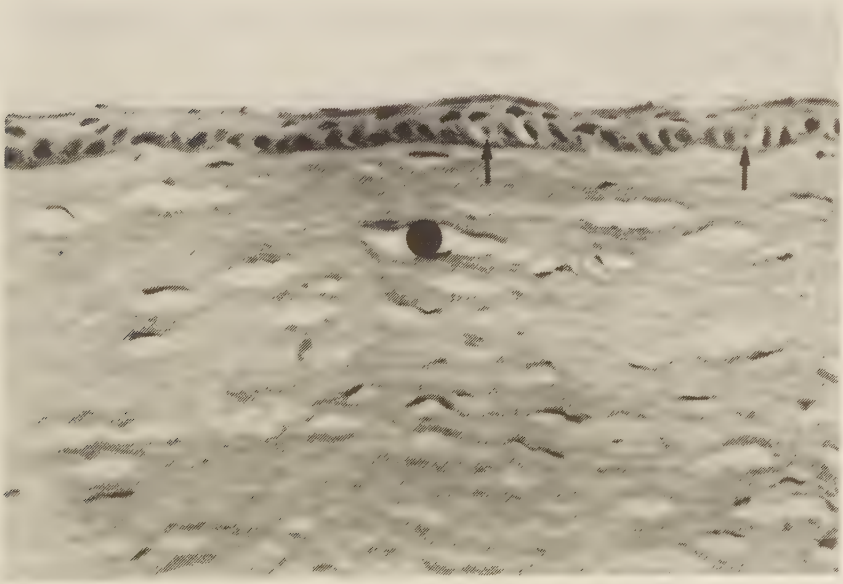


Abb. 10 u. 11: Tier IV, re. Cornea, M.G, 180x bzw. 480x
(1 % TFT Tropfen 4 1/2 Tage, 11 Tage nach Therapieende)
● Stromaödem, ↑ Zellnekrose, ↑ aktivierte Fibroblasten



IV. Dank

Herrn Prof. Dr. med. J. WOLLENSAK, Ärztlicher Direktor der Universitätsaugenklinik im Klinikum Charlottenburg, sei an dieser Stelle für die Überlassung des Themas, der großzügigen Unterstützung während der experimentellen Arbeiten und der kritischen Diskussion der Ergebnisse gedankt.

Herrn Prof. Dr. med. K.-E. GILLERT, Leitender Direktor und Professor der Immunologie im Robert-Koch-Institut, gilt der Dank für die großzügige Bereitstellung der Räumlichkeiten, des tierpflegerischen Personals und den kritischen Anregungen.

Herrn Dr. med. H.-J. NEESE, Assistent an der Universitätsaugenklinik im Klinikum Charlottenburg, ist zu danken wegen seiner unermüdlichen und zeitlich aufwendigen Unterstützung während der experimentellen Arbeit.

Herrn Prof. F. BLUEMCKE, Leitender Direktor des Pathologischen Institutes am Klinikum Charlottenburg sowie seinen Mitarbeitern, Frau A. POPP, Leitende Forschungs-MTA, und Herrn Dr. med. F. PFANNKUCH, gilt der Dank wegen ihrer großzügigen Unterstützung bei der Anfertigung und Beurteilung der histologischen Präparate.

X. Lebenslauf

Am 26.3.1953	geboren in Stade, Niedersachsen als erster Sohn den Eheleuten, Dr. med. Otmar Nekarda und Frau Edith Nekarda, geb. Baltzer
vom 10.4.1959 bis 9.2.1972	schulische Ausbildung und Abitur im altsprachlichen Teil des Gymnasiums in Stade
WS 72/73 bis SS 74	Viersemestriges Studium der Informatik und Biophysik an der Technischen Universität Karlsruhe
1.9.1974 bis 31.8.1975	Ableistung eines "sozialen Jahres" am Diakonissen Krankenhaus Mannheim
WS 75/76	Studium der Tiermedizin an der FU Berlin
SS 76 bis 18.6.1982	Studium der Humanmedizin an der FU Berlin mit Approbation als Arzt in Berlin
18.10.1982 bis 12.3.1983	Internistische Weiterbildung als Vertretungsarzt am Universitätsklinikum Charlottenburg, Berlin, in der Fettstoffwechselambulanz unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. W. Schwartzkopff
seit dem 14.3.1983	Wissenschaftlicher Assistent in dem Institut für Pathologie des Universitätsklinikum Steglitz, Berlin

Papyrus-Druck GmbH Berlin ☎ 3416451
Dissertationen